

UNIVERSITE DE GENEVE

FACULTE DES SCIENCES

Département de biochimie

Laboratoire de chimie biologique
et organique spéciale

Professeur J. Deshusses

ETUDE DES MANNOLIPIDES D'UNE LEVURE SCHIZOSACCHAROMYCES POMBE

THESE

présentée à la faculté des sciences de l'Université de Genève
pour obtenir le grade de docteur ès sciences chimiques

par

Monique WOLCZUNOWICZ-ZURN

de Genève

THESE No 1652

1974

GENEVE

Imprimerie de la Section de physique

1976



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41545931_0056

UNIVERSITE DE GENEVE

Département de biochimie

Laboratoire de chimie biologique
et organique spéciale

FACULTE DES SCIENCES

Professeur J. Deshusses

ETUDE DES MANNOLIPIDES D'UNE LEVURE SCHIZOSACCHAROMYCES POMBE

THESE

présentée à la faculté des sciences de l'Université de Genève
pour obtenir le grade de docteur ès sciences chimiques

par

Monique WOLCZUNOWICZ-ZURN

de Genève

THESE No 1652

GENEVE

Imprimerie de la Section de physique

1976

La faculté des sciences, sur le préavis du professeur J. DESHUSSES,
directeur de thèse et d'une Commission composée des professeurs
P. BARGETZI (Faculté des Sciences), E. CHAROLLAIS (Faculté
des Sciences) et P. FAVARGER (Faculté de Médecine)

autorise l'impression de la présente thèse, sans exprimer d'opinion
sur les propositions qui y sont énoncées.

Genève, le 22 mars 1974

Le Doyen : Jean MULLER

Thèse N° 1652



Ce travail a été effectué sous la direction du Professeur Jacques DESHUSSES auquel je tiens à exprimer toute ma reconnaissance pour l'intérêt constant qu'il a accordé à mon travail et pour les conseils précieux qu'il m'a prodigués tout au long de ces recherches.

Je tiens à remercier également les Professeurs P. FAVARGER, J-P. BARGETZI et E. CHAROLLAIS (Chargé de cours) qui ont bien voulu accepter d'être les co-rapporteurs de ce travail.

Mes remerciements vont également à Mesdames Danièle RIEM et Joëlle LEUBA pour leur assistance technique.

A MES PARENTS

ET A MON MARI

Le mannose est un sucre dont l'importance est primordiale aussi bien dans les polysaccharides des parois de levures et de champignons que dans des lipides associés aux membranes chez de nombreux microorganismes.

La guanosine-diphospho-mannose est généralement la source de reste mannosyle pour les polysaccharides et les lipides.

L'impulsion primaire de ce travail a été dans une étude de biosynthèse de parois cellulaires de levure où on avait remarqué une incorporation inattendue et appréciable de mannose dans les lipides.

L'idée directrice de ce travail a été de caractériser ces mannelipides et de rechercher s'il y avait certaines relations avec les polymères: oligosaccharides, polysaccharides ou autres. Ceci a nécessité entre autre la mise au point de techniques appropriées à ce nouveau matériel.

1 - I N T R O D U C T I O N

1 - 1 Les nucléotides-sucres.

Depuis plusieurs années on connaît le rôle primordial des nucléotides-sucres dans la formation des polysaccharides, des glycolipides et des glycoprotéines.

1 - 1 - 1 - Généralités. (1)

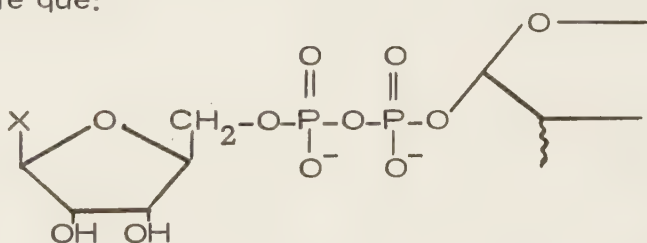
En 1952, Park (2) isole 3 substances complexes donnant à l'hydrolyse du phosphore, des amino-sucres et des acides aminés à partir de bactéries traitées par la pénicilline. Cette découverte, ainsi que les études effectuées par Leloir (3) montrent le rôle des nucléotides à uridine comme "coenzymes" dans le métabolisme des sucres.

Toute une série de nucléotides-sucres, d'abord à base d'uridine puis ensuite avec d'autres bases, ont été isolés à partir d'une grande variété de sources naturelles.

La structure générale de ces composés suit toujours le même principe. Elle comprend une liaison ester entre le phosphate terminal du nucléotide et le carbone aldéhydique du sucre (formule 1)

X= une base telle que:

1
Adénine
Uracile
Cytosine
Inosine
Thymine
Guanine



Biosynthétiquement le nucléotide-sucre est formé par une réaction enzymatique entre un triphosphonucléotide et un sucre-1-P, catalysée par des enzymes appelés pyrophosphorylases ou, d'une façon plus systématique, nucléotidyltransférases (formule 2).



Les réactions impliquant des nucléotides-sucres sont de deux types principalement:

a) transfert de restes glycosyles: par exemple l'UDPGlc agit comme donneur de glucose avec le fructose-1-P pour former du saccharose-P (formule 3) ou avec le glucose terminal d'une

molécule de glycogène pour l'allongement de la chaîne de glucose (formule 4).

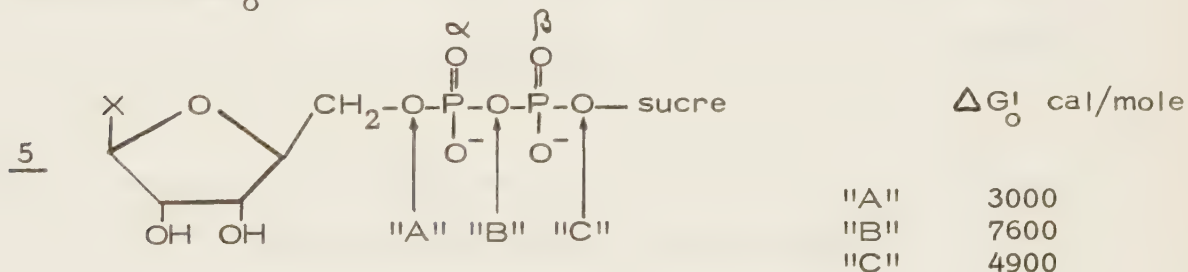


D'une façon similaire l'UDP-acétylglucosamine et l'UDP-glucuronate sont des précurseurs de nombreux polysaccharides complexes.

b) Interconversion de sucre tel que l'interconversion de l'UDPGlc en UDP-galactose, l'oxydation de l'UDPGlc en UDP-glucuronate ou encore la décarboxylation de l'UDP-glucuronate en UDP-xylose. Autrefois on pensait que l'épimérisation du glucose en galactose se faisait avec les UDPGlc et UDP-galactose comme coenzymes; on sait actuellement que ces nucléotides-sucres sont les substrats réels de l'enzyme.

1 - 1 - 2 Hydrolyse des nucléotides-sucres.

L'énergie libre d'hydrolyse des diverses liaisons a été calculée sur l'UDPGlc (4) et leurs valeurs peuvent être étendues par analogie aux autres nucléotides-sucres. Sur la formule 5 on indique ces valeurs de $\Delta G_o'$.



On remarque que dans tous les cas de transfert c'est la liaison entre le sucre et le phosphate β qui est rompue.

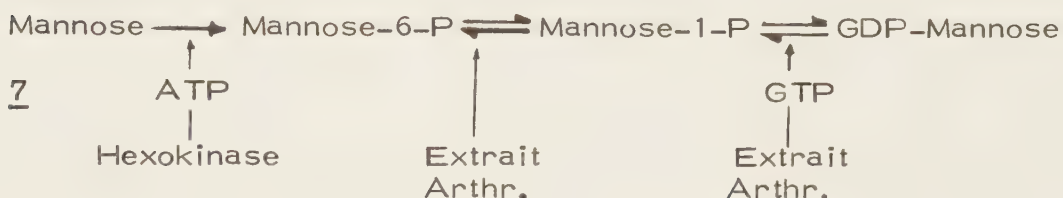
1 - 1 - 3 Guanosine-nucléotide.

On connaît moins de réactions impliquant les dérivés de la guanine que ceux de l'uridine. Parmi ceux-ci, le plus important est le GDP-mannose qui a été isolé à partir de levures par Cabib et Leir (5) et dont la biosynthèse suit le schéma habituel à partir de

GTP et de α -mannose-1-P. Cette réaction est catalysée par une phosphorylase mise en évidence pour la première fois chez Saccharomyces fragilis par Munch et Peterson (6) (Réaction 6).



Preiss et Wood (7) trouvent que l'activité de la GDP-mannose pyrophosphorylase est très élevée chez Arthrobacter, si bien que ces auteurs (8) peuvent mettre au point une méthode enzymatique préparative de GDP-mannose radioactif à partir de mannose marqué en couplant l'hexokinase de levure et des extraits d'Arthrobacter (formule 7).



La constante d'équilibre de la GDP-mannose pyrophosphorylase est du même ordre de grandeur que celle des autres pyrophosphorylases dans les conditions données (7) c'est-à-dire pratiquement réversible.

Comme pour les uridines nucléotides-sucres, le GDP-mannose peut subir des transformations sur la partie sucre de la molécule. Des extraits acellulaires non purifiés contiennent encore de nombreux enzymes capables d'effectuer ces transformations ce qui complique notablement les résultats des expériences.

Le tableau suivant montre les principales réactions décrites dans la littérature concernant le GDP-mannose.

Tableau I

Réactions concernant le GDP-mannose

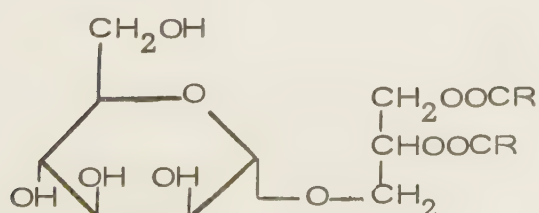
<u>Produit formé</u>	<u>Sources</u>	<u>Références</u>
Glycolipides	Hela Cells	(9)
Glycoprotéines	E. Coli	(10)
Chaîne latérale de l'O antigène	Salmonella typhimurium	(11-12 et 13)
Mannanes	Hansenula holstii	(17)
Mannanes (accepteur lip.)	Hansenula holstii	(18)

Mannolipides	Foie de hamster	(19 et 20)
Mannanes (accepteur lip.)	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	(21-22-23-24 et 25)
Polysaccharides capsulaires	<i>Aerobacter aerogenes</i>	(26)
Lipides (accep. lip. artificiel)	<i>Phaseolus aureus</i>	(27)
Mannolipides	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	(28 et 29)
Glycoprotéines (accepteur lip.)	Souris	(30)
Polysaccharides	<i>Cryptococcus laurentii</i>	(31 et 32)
Lipides	Foie	(33)
Lipides	<i>Aspergillus niger</i>	(34)
Mannolipides	<i>Corynebacterium aquaticum</i>	(35)
Mannanes	<i>Saccharomyces carlsbergensis</i>	(36 et 37)
Mannolipides	<i>Micrococcus lysodeikticus</i>	(38-39-40 et 41)

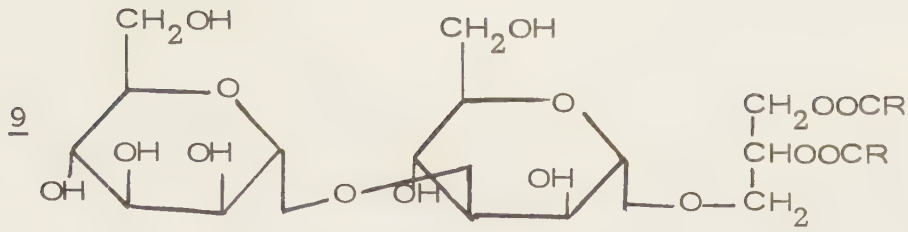
1 - 2 Rôle et fonction du mannose. Nature des lipides à mannose.

1 - 2 - 1 Mannosyldiglycérider.

En 1961 Macfarlane (43) isole un nouveau glycolipide: le mannosyldiglycérider (8) à partir de *Micrococcus lysodeikticus* (M. l.) et en 1964, Lennarz (44) caractérise chimiquement un nouveau composé: le dimannosyldiglycérider (9) et pose l'évidence d'une biosynthèse enzymatique de ce composé ainsi que de deux autres lipides contenant du mannose.



α -D-mannosyl-(1 $\rightarrow$ 3)-diglycérider



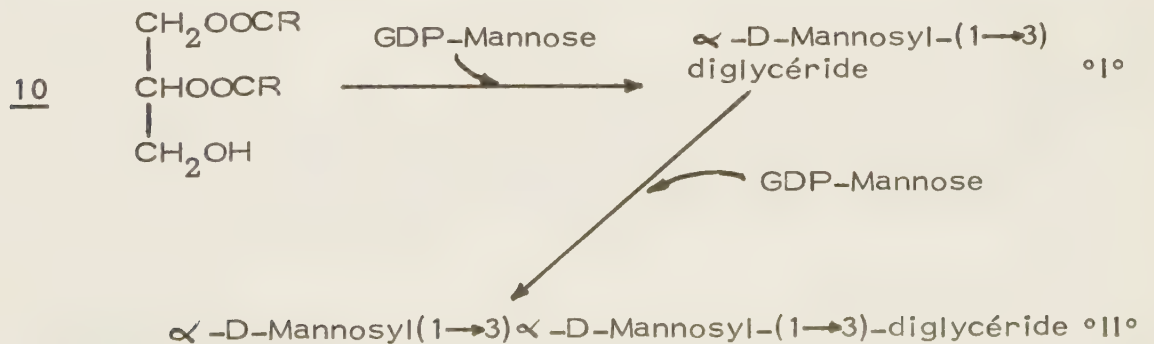
α -D-mannosyl(1 $\rightarrow$ 3) α -D-mannosyl(1 $\rightarrow$ 3)diglycéride

En 1966 Lennarz et Talamo (38) établissent la présence de deux enzymes impliqués dans la biosynthèse des glycolipides chez M. lysodeikticus. Un de ces enzymes est associé à la fraction particulaire et catalyse la formation de α -D-mannosyl(1 $\rightarrow$ 3)-diglycéride à partir de GDP-mannose et de 1-2-diglycéride. Cet enzyme est spécifique du 1-2-diglycéride et manifeste une activité maximale avec les 1-2-diglycérides estérifiés par des chaînes d'acides gras ramifiés; il est stimulé par les ions Mg^{++} et demande des agents tensioactifs dont les plus énergiques sont les sels d'acides gras ramifiés que l'on trouve naturellement chez M. lysodeikticus.

L'enzyme étant particulaire, c'est-à-dire intégré dans une configuration préférentielle de la matrice de la membrane, il existe deux explications possibles en ce qui concerne la fonction de l'agent actif:

- 1) il peut modifier les propriétés physiques du diglycéride de manière à faciliter les interactions entre le substrat hydrophobe de l'enzyme fixé à la membrane.
- 2) il peut agir au niveau de l'enzyme ou des particules contenant l'enzyme en produisant une surface hydrophobe qui favoriserait l'interaction du substrat avec l'enzyme.

Le monomannosyl-diglycéride subit une transformation : par réaction avec une molécule de GDP-mannose il y a fixation d'un second reste glycosidique pour obtenir le dimannosyl-diglycéride. L'enzyme catalysant cette réaction est cette fois un enzyme soluble(10).



Comme on l'a vu précédemment, Macfarlane identifie $\alpha 1^\circ$ comme étant le lipide le plus important chez M. l. ce qui est en contradiction avec les observations de Lennarz (38), ce dernier n'ayant jamais pu mettre en évidence ce composé dans des cellules intactes. Ce désaccord vient probablement des différences entre les souches de M. l. et les conditions de culture.

On peut aussi faire une remarque cinétique : avec des préparations partiellement purifiées d'enzyme, ainsi qu'avec des extraits bruts, la vitesse de synthèse du produit $\alpha 11^\circ$ est beaucoup plus lente que celle de $\alpha 1^\circ$, ce qui n'est pas le cas in vivo puisque $\alpha 11^\circ$ est le lipide principal extrait à partir de cellules de M. lysodeikticus.

On peut faire un rapprochement entre la composition de l'enveloppe bactérienne et la présence de certains glycolipides. Chez M. lysodeikticus la présence de ces mannosides est à comparer avec la présence de mannose, alors que les pneumocoques qui contiennent des galactosyl-diglycérides produisent un polysaccharide qui contient des unités galactosyl-glucosyles.

On pense que le rôle de ces glycolipides est strictement structurel, c'est-à-dire impliqué dans la matrice de la membrane et que les interactions entre les glycolipides relativement polaires facilitent la fixation des polysaccharides et des protéines sur la partie hydrophobe. Il se peut également qu'il y ait une relation entre la biosynthèse de ces lipides et celle des polysaccharides liés à l'enveloppe cellulaire.

1 - 2 - 2 Phosphatidyl-inositol-mannosides.

Chez les Mycobactéries, on peut isoler des lipides contenant du myo-inositol dont la structure diffère des phosphoinositides classiques par le fait de leur teneur élevée en mannose.

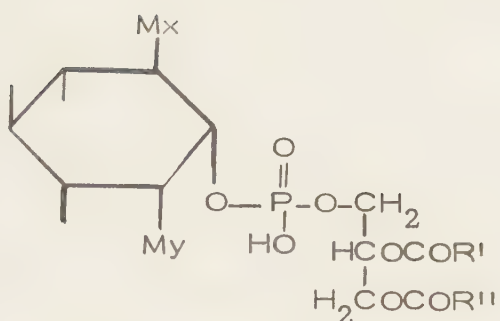
Vilka et Lederer (45) ainsi que Angyal et Shelton (46) suggèrent que les phospholipides mycobactériens sont groupés en une famille de composés où de courts chaînons de résidus mannosyles liés $\alpha -1,6$ sont fixés sur le noyau cyclitol.

Lee et Ballou (47) en 1964 étudient la structure des di- et pentamannosides mycobactériens par oxydation périodique et par méthylation; ils arrivent à la conclusion que ces phospholipides chez M. phlei et M. tuberculosis ont leurs résidus mannoses liés en position 2 et 6 de l'inositol (formule 11).

Dimannoside (x et $y = 1$)

Pentamannoside ($x + y = 5$)

11



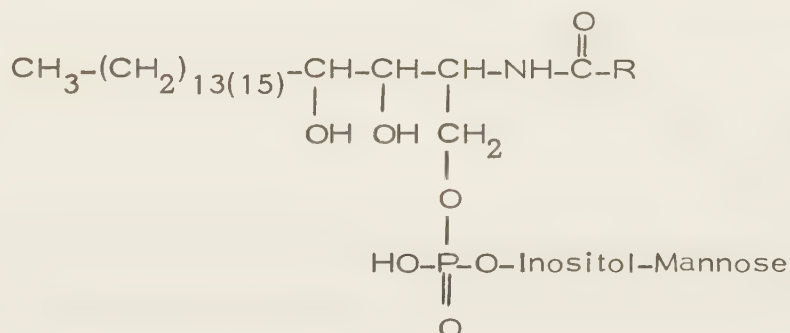
Ces phosphoinositides di- et pentamannosides sont sérologiquement actifs (48) et la synthèse des composés mono- et dimannosides a été étudiée (29).

1-2-2 Sphingolipides

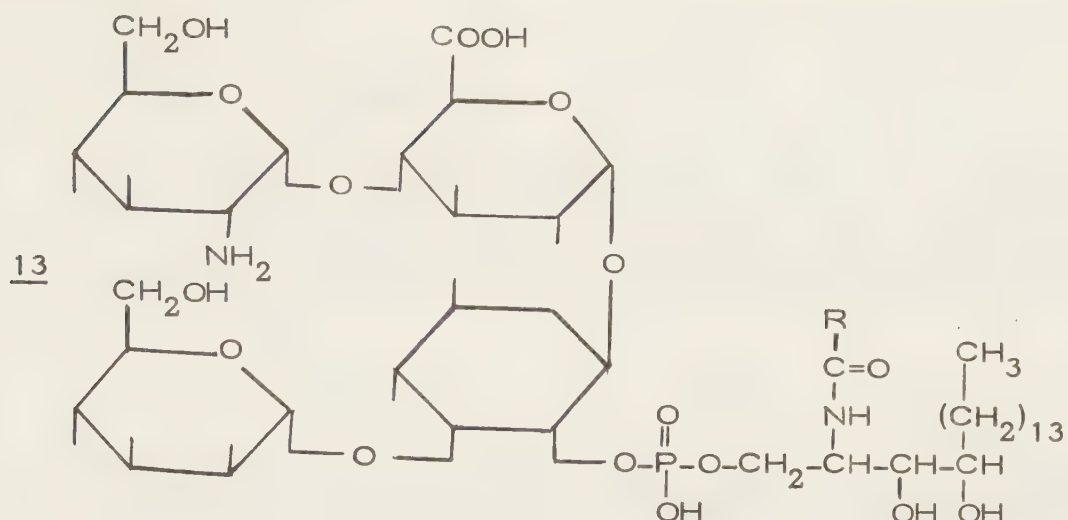
1-2-2-1 Sphingolipides et phytolipides

En 1966, Wagner et collaborateurs (49) isolent à partir de Candida utilis et de Saccharomyces cerevisiae un sphingolipide contenant aussi du phosphore, de l'inositol et du mannose. Ce mycolipide est le premier sphingolipide de ce genre isolé à partir de microorganisme (Formule 12).

12

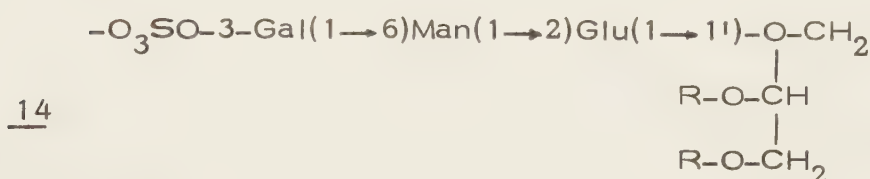


Carter et collaborateurs (50) isolent et caractérisent partiellement un phytoglycolipide (un type de glycolipide complexe) à partir d'une variété de semence de plante. Par dégradation sélective, ces auteurs peuvent donner la structure partielle sans pouvoir toutefois déterminer la séquence des sucres dans la partie oligosaccharidique. Ils décrivent également (51) un phytoglycolipide de blé dont la structure est la suivante (Formule 13). Par hydrolyse alcaline, ce composé donne un tétrasaccharide : (2-mannosido-6-(D-glucosamido-(1→4)-D-glucuronido) inositol).



1-2-3 Sulfoglycolipides

Un glycolipide sulfaté particulier, dont la structure est la suivante (Formule 14), est décrit chez les bactéries extrêmement halophiles (52).

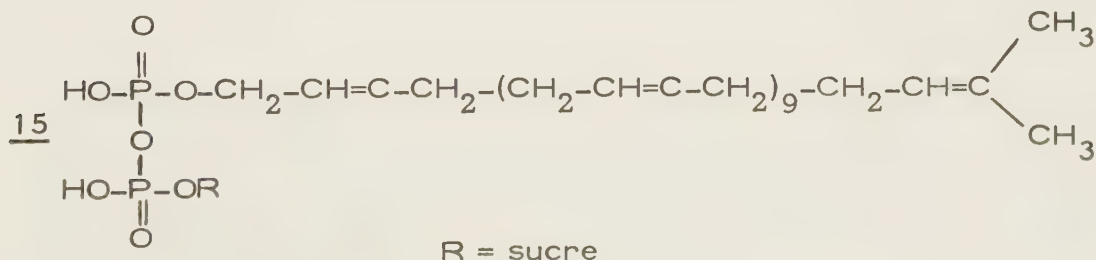


R = C₂₀H₄₁ = phytanyl

1-2-4 Dérivés polyprénol-sucres (53)

1-2-4-1 Lipide intermédiaire dans la biosynthèse des peptidoglycanes de l'enveloppe bactérienne

Strominger et collaborateurs (54) montrent qu'un glycolipide de propriétés inhabituelles sert d'intermédiaire obligatoire dans la biosynthèse des peptidoglycanes de M. lysodeikticus et Staphylococcus aureus. Il s'agit d'un alcool polyisoprénique contenant 11 unités isoprènes; cet alcool est lié par un groupe pyrophosphate à l'extrémité réductrice du sucre (Formule 15).

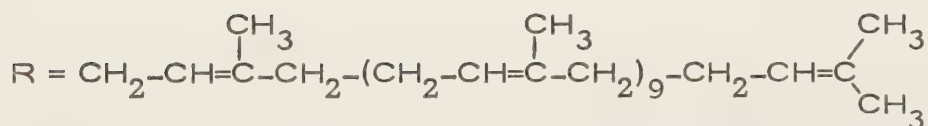
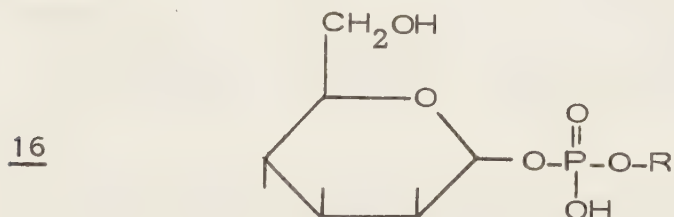


1 - 2 - 4 - 2 O-antigène

Un dérivé d'un polyisoprenylphosphate sert de groupe activateur dans l'allongement de la chaîne de l'O-antigène. L'allongement de la chaîne se fait sur ce lipide et cette dernière est ensuite transférée sur le polymère. La liaison entre le sucre et l'alcool polyisoprénique se fait par l'intermédiaire d'un pont phosphodiester et non pas d'un pyrophosphate.

1 - 2 - 4 - 3 Mannanes

D'un autre côté, un lipide de structure analogue, avec un mannose lié comme phosphodiester, est un intermédiaire de la synthèse des mannanes de l'enveloppe de M. lysodeikticus. Le système utilise le GDP-mannose comme donneur de sucre. L'accepteur lipidique nécessaire au transfert initial du mannose est isolé, purifié et caractérisé: il s'agit de l'undécaprénol phosphate. Le glycolipide est également purifié: c'est un mannosyl-1-phosphoryl-undécaprénol (formule 16) où le résidu undécaprénol contient deux doubles liaisons internes "trans" et huit liaisons "cis" dont la position n'est pas encore déterminée.

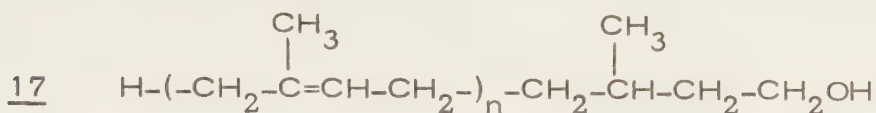


La production d'un mannolipide insensible aux alcalis, mais acido-labile, est mise en évidence par incubation d'une préparation particulière de M. tuberculosis avec du GDP-mannose(28). La formation de ce dernier est accompagnée de production de GDP et l'addition d'un excès de GDP exogène inhibe la synthèse du mannolipide.

Le mannose est le seul sucre libéré par l'hydrolyse acide. La structure du lipide: mannosyl-1-phosphoryl-undécaprénol est établie (par spectrométrie de masse), mais sa fonction chez M. tuberculosis reste à établir.

Les mannanes sont aussi des composants des parois cellulaires de levures. Tanner (25) décrit la synthèse, à partir d'une préparation particulière de S. cerevisiae et de GDP-mannose marqué, d'un lipide acido-labile contenant du mannose. Ce lipide se forme plus rapidement que les mannanes; en cas d'incubation prolongée, la synthèse des mannanes augmente sans qu'il y ait d'augmentation de radioactivité dans la fraction lipidique.

Ces mêmes auteurs (23) montrent que le dolichol-monophosphate (formule 17) de levure ou de foie peut servir d'accepteur lipidique dans le transfert du mannose chez S. cerevisiae.



L'addition de dolichol-monophosphate à la préparation particulière de levure augmente la radioactivité d'un produit insoluble dans l'alcool et l'addition de GDP produit une diminution de la radioactivité lipidique. Ce système semble identique à celui de M. lysodeikticus et les auteurs suggèrent la formation d'un pont phosphodiester comme dans l'intermédiaire de M. lysodeikticus.

Une réaction semblable est décrite par Sentandreu et Lampen (21) chez S. cerevisiae. La vitesse d'incorporation du mannose à partir de GDP-mannose dans un mannolipide alcali-résistant et dans les mannanes, ainsi que la diminution de la radioactivité après addition tardive de GDP-mannose non marqué, montrent que le mannolipide est un précurseur dans la synthèse des mannanes. Cet intermédiaire est identifié après purification : comme dans les autres cas, il s'agit du mannosyl-1-phosphoryl-undécaprénol (40). Ces résultats sont confirmés par Jung et Tanner (24).

Bretthauer et Irwin (18) isolent également un mannolipide à partir de *Hansenula holstii* qui ressemble à un polyisoprénol par ses propriétés chromatographiques et chimiques.

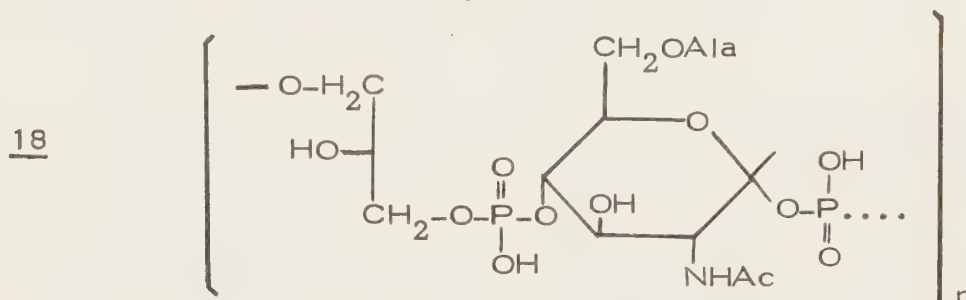
1-2-4-4 Polysaccharides capsulaires

La biosynthèse des polysaccharides capsulaires avec participation d'un intermédiaire lipidique chez Aerobacter aerogenes est démontrée par Troy et collaborateurs (26). Le polysaccharide est composé d'unités trisaccharidiques répétées : galactosyl-mannosyl-galactose avec une ramification d'un reste glucuronate par mannose.

Ce genre de glycolipide ne semble pas être restreint au groupe mannosyle, puisqu'à partir de l'UDP-gal. il y a formation de lipide galactosyl-pyrophosphoryl-undécaprénol qui constitue la première étape vers la synthèse des polysaccharides. L'accepteur lipidique est caractérisé par RMN comme étant un undécaprénol phosphate. Ce lipide ajouté à une préparation particulière exempte de lipides endogènes, restaure l'activité enzymatique et fonctionne comme accepteur pour la synthèse des mannanes chez M. lysodeikticus. L'équivalence fonctionnelle des accepteurs lipidiques de M. lysodeikticus et de A. aerogenes n'indique pas nécessairement que leur structure est identique, puisqu'il semble que les enzymes n'ont pas de spécificité absolue pour l'accepteur.

1-2-5 Acide teichoïque

L'acide teichoïque décrit par Hussey et Baddiley (55) de la paroi de Staphylococcus lactis 13 consiste en unités répétées de D-glycérol-1-P attachées en position 4 de 6-O-D-alanyl-N-acétyl-glucosamine-1-P (formule 18).



Douglas et Baddiley détectent l'accumulation d'un intermédiaire lipidique contenant N-acétylglucosamine pendant la biosynthèse de l'acide teichoïque chez S. lactis 13.

1-2-6 Systèmes des plantes et des animaux.

La découverte d'intermédiaire lipidique dans la synthèse des polysaccharides n'est pas confinée au système bactérien. La découverte des polyisoprénols chez les plantes supérieures porte à croire que des réactions analogues à celles décrites ci-dessus ont lieu dans le système végétal.

Kauss (56) observe l'incorporation de mannose à partir d'une préparation particulière de pousses de haricots dans un lipide ainsi que la formation de mannanes. Villimez et Clark (57) suggèrent qu'il s'agit d'un dérivé polyisoprénol phosphate analogue au lipide intermédiaire impliqué chez M. lysodeikticus.

En 1969 Caccam et collaborateurs (58) détectent la formation d'un lipide contenant du mannose dans une fraction membranaire "smooth" de foie de lapin qui catalyse la synthèse de glycoprotéines à partir de GDP-mannose. Il existe un intermédiaire lipidique qui ressemble aux autres intermédiaires isoprénofiques par son acidolabilité et sa résistance vis à vis des alcalis.

La nature de la partie lipidique de l'intermédiaire glycolipidique chez les mammifères est étudiée par Allam et collaborateurs (59). La participation de dolichol dans la biosynthèse d'un autre glycolipide, caractérisé comme étant le dolichol-monophosphate-glucose, est mise en évidence par Behrens et Leloir (60). En 1973 Maestri et Luca (20) montrent qu'un mannosylphosphate marqué, isolé du foie de hamster, se révèle un donneur de mannose plus efficace que le GDP-mannose pour des glycoprotéines endogènes. Waechter (61) étudie la cinétique du transfert de mannose à partir de GDP-mannose sur un accepteur endogène des membranes de l'oviducte de poule et révèle, qu'en plus du mannosyl-phosphoryl-polyisoprénol, deux autres composés marqués sont également formés. Le premier est de structure inconnue, quant au second, il s'agit de protéines contenant un ou plusieurs résidus mannoses.

2 - P A R T I E E X P E R I M E N T A L E

2-1- MATERIEL ET METHODES

2-1-1 Cellules utilisées et milieux de culture

Les cellules utilisées sont :

a) Levure : Schizosaccharomyces pombe Lindner CBS (S. p.)

b) Bactérie: Micrococcus lysodeikticus (souche labo) (M. l.)

2-1-1-1 Schizosaccharomyces pombe (S. p.)

Les souches sont gardées sur agar nutritif à 3° C. et repiquées régulièrement tous les mois. Pour obtenir des cellules en grande quantité, la souche est inoculée dans un milieu intermédiaire où la croissance est très rapide pour 18 h. à 30° C. Elles sont alors recueillies par centrifugation, lavées et resuspendues dans de l'eau de façon à avoir une turbidimétrie de 150 unités au photomètre Klett (filtre 54). Pour ensemercer le milieu de culture, on utilise cette suspension à raison de 0,5 ml pour 150 ml de milieu de culture. La croissance est obtenue en 20 à 24 h. à 30° sous agitation. Toutes les opérations sont effectuées stérilement.

Milieux de culture utilisés pour S. pombe :

Milieu agar:

Extrait de Malt Difco	15 gr
Yeast Extract Difco	5 gr
D-glucose	5 gr
DL-asparagine	0,5 gr
Agar-agar	25 gr
ad 1 litre d'eau.	

Milieu intermédiaire :

D-glucose	100 gr
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,6gr
KH ₂ PO ₄	1,5gr
NaCl	0,5gr
KCl	0,4gr
FeCl ₃ 1%	0,5ml
Malt Extract Difco	10 gr
Yeast Extract Difco	5 gr
ad 1 litre de milieu	

Milieu de culture semi-synthétique :

D-glucose	30 gr
(NH ₄) ₂ SO ₄	2 gr
KH ₂ PO ₄	2 gr
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,5 gr
CaCl ₂	0,25 gr
Hydrolysate de caséine Difco	1 gr
Solution de vitamines (°)	1 ml
Sol. de myo-inositol (1mgr/ml)	4 ml
ad 1 litre de milieu	

(°) Solution de vitamines :

Vitamine B ₆	100 mgr
Nicotinamide	100mgr
Vitamine B ₁	100mgr
Pantothénate de Calcium D ⁺	100mgr
Solution de biotine à 100 γ /ml	1ml
pour 100 ml de solution.	

2-1-1-2 Micrococcus lysodeikticus (M. l.)

La souche est maintenue sur un milieu agar à 3° C., puis inoculée dans 100 ml de milieu de culture et laissée pendant 10 h. à 30° C. sous agitation. Cette culture sert de "starter" pour de grand volume (4 litres). La fin de la phase logarithmique est obtenue à environ 22 h. sous agitation à 30 ° C.

Milieu agar :

Tryptone	10 gr
NaCl	10 gr
D-glucose	1 gr
Yeast Extract Difco	5 gr
Agar-agar	18 gr
ad 1 litre de milieu	

Milieu de culture :

Bactopeptone	1 ‰
NaCl	0,5 ‰
Yeast Extract	0,1 ‰

2-1-2 Préparation d'homogénats ou de fractions particulières

2-1-2-1 S. pombe.

Les cellules cultivées pendant 20 à 24 h. sont recueillies par filtration sur papier Whatman 80 et lavées 1 fois avec de l'eau, puis une fois avec du tampon phosphate 0,05 M pH 7,8 5mM en β -mercaptoéthanol (appelé tampon phosphate). Dans certains cas, on ajoute 0,4 M de saccharose. Les cellules en suspension dans un égal volume de tampon ci-dessus sont brisées soit à l' "Eaton Press" (réf. 62) soit à la "French Press".

Dans certains cas, l'homogénat total obtenu sera utilisé tel quel pour les incubations enzymatiques. Dans d'autres cas cet homogénat sera fractionné. L'homogénat total en suspension dans le tampon phosphate (40 ml pour l'équivalent de 4 l. de milieu de culture) est centrifugé à 4300 x g pendant 15 min à 4° C. pour séparer les cellules intactes résiduelles et les fragments de parois. Le surnageant est soumis à une nouvelle centrifugation à 35.000 trs/min pendant 1 h. à 4° C. (centrifugeuse Spinco modèle L rotor N° 40); les particules sédimentées sont suspendues dans 3 ml de tampon phosphate (pour 4 l. de culture). Cette fraction représente la fraction particulière.

2-1-2-2 M. lysodeikticus

Les cellules sont recueillies par centrifugation et lavées une fois avec du tampon Tris-HCl 0,02 M pH 7,6. Elles sont ensuite suspendues dans un égal volume de tampon et brisées soit à la "French Press" soit à l' "Eaton Press". La suspension obtenue est traitée par une petite quantité de DNase (38) et lorsque la viscosité de l'homogénat a fortement diminué, la suspension est centrifugée à 4300 x g pendant 10 min. Le surnageant recentrifugé à 35.000 trs/min pendant 1 h. à 4° C. (centrifugeuse Spinco) laisse sédimenter un culot qui est repris par du tampon Tris-HCl et utilisé pour les incubations enzymatiques.

2-1-3 Solubilisation d'enzymes

La solubilisation d'enzymes est effectuée sur les préparations obtenues de S. pombe par des détergents.

2-1-3-1 Première méthode :

Les cellules filtrées sont lavées dans une solution de Triton-X-100 (BDH) à 0,1 %, mises en suspension dans 2 ml de cette même solution et brisées à l' Eaton Press. L'extraction enzymatique se fait par 30 volumes de Triton-X-100 à 0,1 % pendant 20 h. sous agitation à 4° C. On centrifuge ensuite à 20.000 trs/min (centrifugeuse Spinco) et le surnageant obtenu est lyophilisé ou dialysé contre du polyvinylpyrrolidone K 30 (Fluka).

2-1-3-2 Deuxième méthode :

L'extraction se fait sur les particules par le Triton-X-100 à 0,1 % ou le Brij 59 à 2 % dans le tampon Tris-HCl à raison de 3 ml de solution pour un extrait particulaire provenant de 4 litres de culture. La suspension est ensuite soumise aux ultrasons (MSE, 100 W) 4 fois 30 sec. à 1 min. d'intervalle et centrifugée à 20.000 trs/min. pendant 1 h. à 4° C. (centrifugeuse Spinco).

2-1-4 Incubations enzymatiques

Les incubations enzymatiques en présence de GDP-mannose C¹⁴ sont différentes suivant le type de cellules.

2-1-4-1 S. pombe:

La préparation enzymatique est dans le tampon phosphate 0,05 M pH 7,8.

Milieu d'incubation:

Enzyme (environ 50 mgr de protéine/ml)	3000 ul
Solution MnSO ₄ 6mM	3250 ul
Solution GDP-Mannose (UC ¹⁴) (6.10 ⁵ cpm-335 mumoles en GDP-Mannose)	250 ul
Incubation 30 min. à 30° C. sous agitation.	

2-1-4-2 M. lysodeikticus.

La préparation enzymatique est dans le tampon Tris-HCl 0,02 M. pH 7,6.

Milieu d'incubation:

Tampon Tris-maléate pH 8,3	500 umoles
Tampon Tris-HCl pH 7,6	120 umoles
GDP-Mannose	1 umoles
GDP-Mannose UC ¹⁴	5. 10 ⁵ cpm
Enzyme	40-200 mgr protéines
Volume total: 7 ml	
Incubation 30 min à 30 ° C. sous agitation.	

2-1-5 Extraction des lipides.

Les lipides sont extraits du milieu d'incubation par adjonction de 20 volumes de CHCl₃-MeOH 2/1. On agite 5 min et on chauffe 5 min à 55° C. Cette dernière opération est répétée une seconde fois puis on filtre l'insoluble sur laine de verre et on lave avec environ 5 ml du mélange ci-dessus.

2-1-6 Lavage des lipides bruts.

La solution ci-dessus est lavée avec 0,2 volume d'une solution de NaCl 0,9%. La phase organique résultante est évaporée au Rotavapor, à base température (lipides totaux = fraction 1). La solution NaCl est également évaporée et contrôlée chromatographiquement.

2-1-7 Chromatographies des lipides totaux(fraction 1)

2-1-7-1 Chromatographies préparatives.

a) Chromatographie bidimensionnelle

sur plaque de silice G (Merck) non fluorescente de 0,4 mm d'épaisseur.

Les plaques sont préalablement lavées dans deux dimensions par le mélange CHCl₃-MeOH-H₂O (65-25-4) et chauffées pendant 2 h. à 110° avant l'emploi.

Solvants:

Première dimension : CHCl₃-MeOH-7 N NH₄OH (65-30-4)

Deuxième dimension : CHCl₃-MeOH-AcOH-H₂O (170-25-25-6)

b) Colonne de DEAE-Cellulose forme acétate.

Avant de préparer la colonne, la DEAE-Cellulose (Whatman) est régénérée de la façon suivante : la cellulose est mise en suspension dans 2 à 3 volumes de HCl 1 N pendant 5 min, filtrée puis lavée avec de l'eau jusqu'à neutralité. On effectue la même opération avec NaOH 0,1 N.

La DEAE-Cellulose est ensuite traitée par l'acide acétique glacial 100% pendant 1 h., filtrée et lavée jusqu'à neutralité avec MeOH. On remplit la colonne avec une suspension méthanolique de DEAE-Cellulose forme acétate et on lave la colonne avec 500 ml de MeOH, puis 500 ml de CHCl_3 -MeOH 2/1 et enfin avec 500 ml de CHCl_3 . L'élution des produits lipidiques se fait de la façon suivante :

- a) 500 ml de CHCl_3 -MeOH- H_2O (20-9-1)
- b) gradient de CHCl_3 -MeOH- H_2O (20-9-1) NH_4OAc (soit 15,4 gr de NH_4OAc dans 500 ml de CHCl_3 -MeOH- H_2O)
- c) 300 ml d'une solution contenant 200 ml de CHCl_3 -MeOH- H_2O (20-9-1) et 100 ml de AcOH.

2-1-7-2 Chromatographies analytiques

a) sur papier SG 81 Whatman (papier imprégné par de la silice)
Solvant : CHCl_3 -MeOH-4 N NH_4OH (9-7-2)

b) sur plaque de silice G monodimensionnelle (0,25 mm)
Solvant : CHCl_3 -MeOH-AcOH- H_2O (180-80-6-10)

Les plaques sont traitées comme sous 2-1-7-1a

2-1-8 Déacylation alcaline des lipides totaux (fraction 1)

a) Selon la méthode décrite par Scher et Lennarz (39)

La fraction lipidique est évaporée à sec et redissoute dans 16 ml de CHCl_3 -MeOH 1/4. Après addition de 1,5 ml de NaOH 1 N, la solution est incubée 15 min. à 37° C. On ajoute ensuite 1,5 ml d'AcOH 1 N, 30 ml de CHCl_3 -MeOH 9/1, 15 ml d'isobutanol et 30 ml d'eau. Après centrifugation, on recueille la phase aqueuse et on lave la phase organique avec 15 ml de H_2O -MeOH 2/1. Les deux phases aqueuses sont réunies et évaporées à sec sous vide ainsi que la phase organique.

b) Selon la méthode de Brockerhof (63)

Pour 20 à 30 umoles de P lipidique.

Les lipides sont dissous dans 0,2 ml de CHCl_3 auxquels on ajoute 0,8 ml d'une solution 0,125 M de LiOH dans MeOH. On laisse la solution à température ordinaire pendant 15 min. puis on ajoute 3 ml d'eau, 2 ml d'EtOH et 4 ml de CHCl_3 . Après agitation vigoureuse et centrifugation, la phase organique est lavée deux fois avec 1 ml d'une solution de MeOH- H_2O 1/1. Les phases aqueuses sont réunies et desionisées sur une colonne de Dowex 50 x 4 50-100 mesh, forme pyridinium (3cm x 1 cm ϕ).

Les deux solutions aqueuse et organique, sont évaporées sous vide à basse température.

c) Selon la méthode de Dawson et coll. (64)

Pour 10 à 160 mgr de lipides totaux ou 30 à 600 ugr de P lipidique
Les lipides évaporés à sec sous courant de CO_2 sont repris par 0,2 ml de CHCl_3 , 0,3 ml de MeOH et 0,5 ml de NaOH 0,2 N dans MeOH. La solution est bien agitée et laissée 15 min. à température ordinaire. On ajoute ensuite 0,2 ml de MeOH, 0,8 ml de CHCl_3 et 0,9 ml d'eau. Après avoir bien mélangé, on centrifuge 10 min. à environ $1500 \times g$. La solution aqueuse est recueillie, traitée par 0,3 à 0,5 ml de résine cationique Dowex 50 H^+ 50-100 mesh pour obtenir un pH de 5 à 6 et filtrée. La phase organique est lavée avec 0,5 ml de MeOH- H_2O (10/9) et cette solution aqueuse est utilisée pour laver la résine. Les deux solutions, aqueuse et organique, sont évaporées sous vide à basse température.

2-1-9 Chromatographies des produits de déacylation (phase H_2O -Fraction II)

a) Chromatographie sur papier Whatman N°1 ou 3 MM lors des essais préparatifs.

Solvant a) : 1-BuOH-0,1 N HCl-Pyr (50-10-30)(v/v/v)

b) : Prop-2 - H_2O (7/3)(v/v)

c) : Acétate d'éthyle-Pyr- H_2O (12-5-4)(v/v/v)

b) Chromatographie sur colonne de Sephadex-G-15

Faire gonfler la Sephadex-G-15 pendant 1 nuit dans une solution de NH_4HCO_3 0,1 M.

On prépare une colonne de 63 cm x 1,8 cm. La séparation est effectuée avec un débit de 8 ml/h. et on récolte des fractions de 0,4 ml. La colonne est testée préalablement avec 500 ugr de mannose, 500 ugr de raffinose et 100 ugr de Bleu Dextran (Pharmacia) dans une solution de NaCl 10%. Le dosage des sucres est effectué par la méthode de l'anthrone (65).

2-1-10 Hydrolyse par les acides dilués (Fraction III) (15)

Les lipides de la fraction III sont séchés sous courant de CO_2 ; on ajoute 0,5 ml de propanol-1 et 0,5 ml de HCl 0,01 N. La solution est maintenue 5 min. au bain marie bouillant puis refroidie rapidement dans la glace. Après adjonction de 2 ml de NaOH 0,005 N, 3 ml d'eau et 12 ml de CHCl_3 -MeOH 2/1, on centrifuge 10 min. à $4300 \times g$. On recueille la phase supérieure aqueuse et la phase organique est lavée deux fois avec 1 ml de CHCl_3 -MeOH 2/1; les phases aqueuses sont réunies, évaporées et soumises à la chromatographie sur papier (voir 2-1-9a).

2-1-11 Hydrolyse des liaisons glycosidiques par l'acide trifluoroacétique

Pour déterminer les sucres liés sous forme de glycolipides, il est nécessaire d'effectuer une hydrolyse préalable avec l'acide trifluoroacétique 1,2 M en tube scellé pendant 2 h. Après avoir refroidi, on évapore à sec et on reprend 2 à 3 fois par une petite quantité d'eau afin d'éliminer tout l'acide trifluoroacétique.

2-1-12 Chromatographie gazeuse des sucres

Les sucres sont analysés sous forme de dérivés silylés par gaz chromatographie (appareil : Perkin Elmer 900). Les colonnes qui donnent le meilleur résultat sont celles chargées de 5% de XE-60 sur Chromosorb G 100-200 mesh, 180 cm, Ø 1/4 inch avec un débit de 35 ml/min de N₂ comme gaz porteur. La silylation est effectuée à température ordinaire avec un mélange pyridine/hexaméthylidisilane/triméthylchlorosilane (1 ml/0,4 ml 0,2 ml v/v/v). Le mélange brut peut être injecté directement mais, pour éviter un pic très large de pyridine à l'origine, le solvant est évaporé sous vide et le résidu est repris par de l'heptane, qui dissout les dérivés des sucres.

2-1-13 Dosage des protéines

Le dosage des protéines des extraits enzymatiques se fait selon la méthode de Lowry (66) avec l'albumine de sérum de boeuf comme standard.

2-1-14 Mesure de la radioactivité

1-sur papier :

Les chromatographies sur papier sont passées au scanner Actigraph III (Nuclear Chicago) à la vitesse de 30 ou 60 cm/h. ou coupées en morceaux, qui sont comptés dans des pots à scintillation en présence de Toluène/omnifluor 0,4% (compteur à scintillation liquide Beckman LS 250).

2-sur couche mince :

Les spots radioactifs des plaques de silice sont détectés au moyen de l'appareil Berthold LB 2723.

3-lipides :

Les échantillons lipidiques séchés sous courant d'air dans des pots à scintillation sont comptés dans 10 ml de Toluène/omnifluor 0,4% (Compteur Beckman LS 250).

4-fractions aqueuses :

Les aliquotes des fractions aqueuses sont ajustées à 0,5 ml avec de l'eau et comptées en présence de 10 ml de mélange naphthalène-PPO-p-dioxane (100gr-5gr-1000ml).

2-1-15 Microdosage d'activité enzymatique

L'incubation ci-dessous se fait directement dans des capillaires qui sont fermés aux deux extrémités et incubés à 30° C. pendant le temps désiré.

Solution d'enzyme (environ 600 à 1000 ugr prot.)	20 ul
Solution MnSO_4 6 mM	20 ul
Solution GDP-mannose (UC^{14}) ($5 \cdot 10^{-4}$ mmole/ml 5000 cpm)	2 ul

La réaction enzymatique est arrêtée par congélation à -30°C . On procède ensuite à une électrophorèse pour éliminer les métabolites du GDP-mannose porteurs de charges ioniques (tampon acétate pH 5,8; 0,25 M; 20 V/cm).

On découpe ensuite la zone de l'origine (schéma 1) qui est trempée pendant 1 h. dans EtOH 55%. La séparation des lipides, à partir de cette zone de l'origine se fait par migrations successives : 6 fois dans une solution de CHCl_3 -MeOH 2/1 et 6 fois dans CHCl_3 -MeOH- H_2O (400-150-25) (schéma 2). Les petites chromatographies sont découpées en deux parties et les deux zones, origine et lipidique, sont comptées dans le Toluène/omnifluor 0,4% (MM 2-1-14-1).

Schéma 1

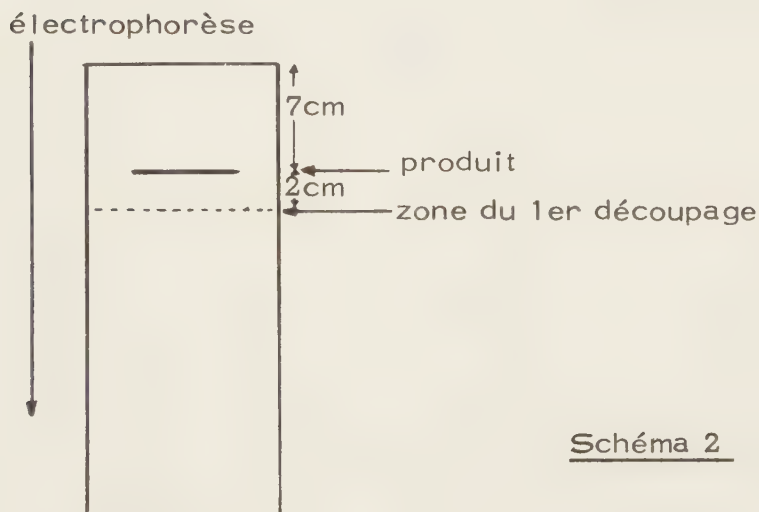
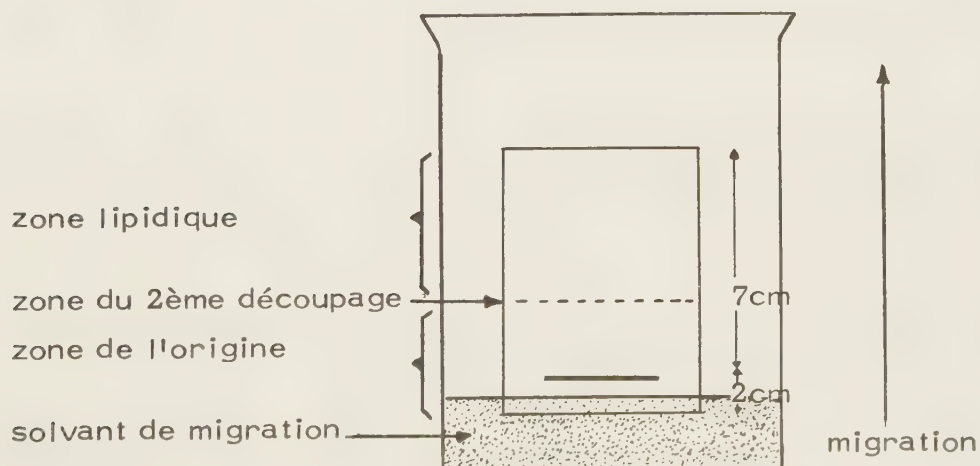


Schéma 2



2-2 RESULTATS

On peut essentiellement distinguer deux phases dans ce travail. Dans la première, les expériences ont pour but la mise au point des techniques, principalement des séparations chromatographiques et celles des conditions enzymatiques. La seconde est consacrée aux réactions d'identification des mannolesphides formés enzymatiquement.

2-2-1 Détermination des conditions d'expériences

2-2-1-1 Effets des diverses méthodes de rupture des cellules sur l'incorporation de GDP-Mannose C14.

Effets des ions Mn^{++} et de Cd^{++} .

a) L'estimation de la concentration optimale en ions Mn^{++} se fait par la méthode des capillaires avec un temps d'incubation de 40 min. (Eaton Press). Les concentrations finales sont : 1 mM, 2 mM, 3 mM, 4 mM, 5 mM et 6 mM (Tableau II)

Tableau II

Conc. Mn^{++} mM	cpm lipidique	cpm non lipidique
1 mM	150	590
2 mM	180	600
3 mM	200	750
4 mM	200	700
5 mM	190	720
6 mM	180	650

Effet de la concentration en ions Mn^{++}
sur l'incorporation de GDP-Mannose C14

Pour étudier l'effet des ions Cd^{++} par rapport aux ions Mn^{++} , et en se basant sur le tableau ci-dessus, la concentration optimale de 3 mM est désormais utilisée.

b) Les cellules sont brisées soit à l'Eaton Press soit à la French Press. Les incubations sont effectuées dans des capillaires en comparant l'effet des ions Mn^{++} et Cd^{++} aux mêmes concentrations. Le temps d'incubation est de 40 min. (Tableau III)

Tableau III

Conc. finale 3 mM	Eaton Press		French Press	
	cpm lipid.	cpm non lip.	cpm lipid.	cpm non lip.
Contrôle	82	490	19	81
Mn^{++} 3 mM	218	829	30	128
Cd^{++} 3 mM	170	714	22	90

Incorporation de GDP-Mannose C14 en présence de ions Mn^{++} et Cd^{++} et traitement par l'Eaton ou la French Press

Si l'on compare les incorporations lipidiques et non lipidiques en présence de Mn^{++} et Cd^{++} , on voit qu'elles sont remarquablement supérieures par rapport au contrôle, aussi bien en présence de Mn^{++} que de Cd^{++} . Dans le cas de l'Eaton Press, la radioactivité lipidique en présence de Mn^{++} est trois fois plus forte que dans le contrôle et environ une fois et demie plus forte qu'en présence de Cd^{++} .

En ce qui concerne les deux méthodes de rupture des cellules, il est démontré que le traitement à l'Eaton Press favorise l'incorporation du mannose dans les deux fractions, lipidique et non lipidique. On peut noter une incorporation 7 fois plus élevée avec le matériel préparé par l'Eaton Press comparé à celui de la French Press.

A la suite de ces résultats, les conditions d'expériences suivantes sont considérées comme standard : rupture de cellules par l'Eaton Press et incubations en présence de ions Mn^{++} à la concentration de 3 mM.

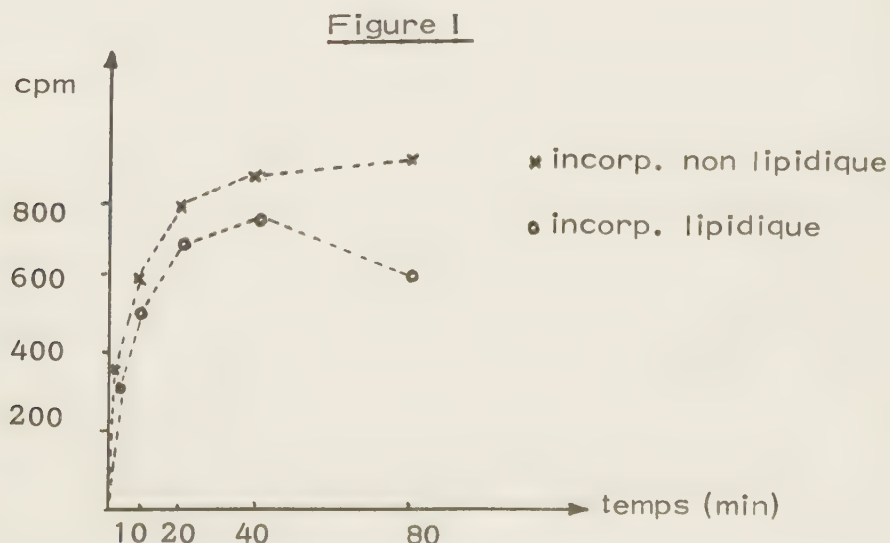
D'autres ions divalents ont été essayés et leurs activités relatives sont données ci-dessous :

Mn^{++} 1,0; Cd^{++} 0,84; Co^{++} 0,57; Fe^{++} 0,38; Zn^{++} 0,1; Ca^{++} 0,05.

2-2-1-2 Incorporation lipidique et non lipidique en fonction du temps

Toujours en vue de déterminer des conditions standards, il faut déterminer la durée optimale d'incorporation du reste mannosyle, en particulier dans la fraction lipidique.

La microméthode en capillaire est utilisée et chaque point des courbes ci-dessous représente la moyenne de 5 déterminations. Les temps choisis sont : 5 min, 10 min, 20 min, 40 min et 80 min. (Figure I)



Si l'on compare les incorporations lipidiques et non lipidiques en présence de Mn^{++} et Cd^{++} , on voit qu'elles sont remarquablement supérieures par rapport au contrôle, aussi bien en présence de Mn^{++} que de Cd^{++} . Dans le cas de l'Eaton Press, la radioactivité lipidique en présence de Mn^{++} est trois fois plus forte que dans le contrôle et environ une fois et demie plus forte qu'en présence de Cd^{++} .

En ce qui concerne les deux méthodes de rupture des cellules, il est démontré que le traitement à l'Eaton Press favorise l'incorporation du mannose dans les deux fractions, lipidique et non lipidique. On peut noter une incorporation 7 fois plus élevée avec le matériel préparé par l'Eaton Press comparé à celui de la French Press.

A la suite de ces résultats, les conditions d'expériences suivantes sont considérées comme standard : rupture de cellules par l'Eaton Press et incubations en présence de ions Mn^{++} à la concentration de 3 mM.

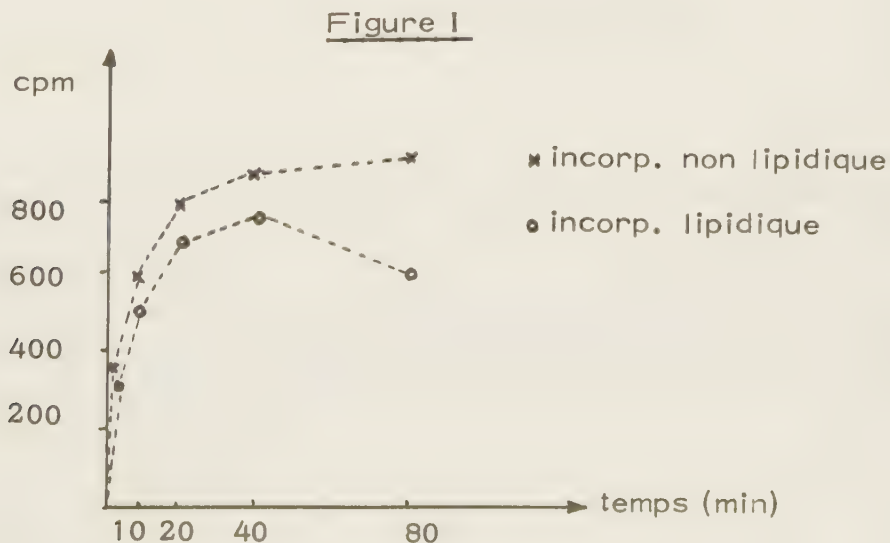
D'autres ions divalents ont été essayés et leurs activités relatives sont données ci-dessous :

Mn^{++} 1,0; Cd^{++} 0,84; Co^{++} 0,57; Fe^{++} 0,38; Zn^{++} 0,1; Ca^{++} 0,05.

2-2-1-2 Incorporation lipidique et non lipidique en fonction du temps

Toujours en vue de déterminer des conditions standards, il faut déterminer la durée optimale d'incorporation du reste mannosyle, en particulier dans la fraction lipidique.

La microméthode en capillaire est utilisée et chaque point des courbes ci-dessous représente la moyenne de 5 déterminations. Les temps choisis sont : 5 min, 10 min, 20 min, 40 min et 80 min. (Figure I)



On observe que si l'incorporation non lipidique augmente constamment en fonction du temps, l'incorporation lipidique atteint un maximum entre 30 et 40 min, puis accuse une diminution pour des incubations prolongées.

Une durée d'incubation de 30 min. est choisie pour la plupart des expériences.

2-2-2 Etude des Mannolipides de *S. pombe*

Les lipides obtenus après incubation de la fraction particulière de *S. pombe* avec du GDP-Mannose marqué sont extraits dans une phase organique. Ils sont contaminés par plusieurs produits radioactifs non lipidiques dans cet extrait. Ces produits de contamination sont éliminés par un lavage de la phase organique par une solution de NaCl 0,9%.

Une chromatographie de cette fraction NaCl sur papier Whatman N° 1 permet de détecter du mannose, du mannose-phosphate et du glycérol, tous radioactifs et provenant de la dégradation enzymatique du GDP-Mannose.

Le tableau ci-dessous indique les quantités de radioactivité incorporée dans les deux fractions, lipidique et phase NaCl : valeurs extrêmes d'une dizaine d'expériences (Tableau IV).

<u>Tableau IV</u>		
% incorporation lipidique	% incorporation phase NaCl	umoles Mannose C ¹⁴ incorporées par 10 mgr de protéines
3, 8-15, 5%	11-24, 2%	1, 35-4, 14

Radioactivité incorporée lors des
incubations de fractions acellulaires
de *S. pombe* avec du GDP-Mannose C¹⁴.

Le pourcentage d'incorporation varie passablement suivant les expériences effectuées (Tableau IV), bien que celles-ci soient effectuées dans les mêmes conditions (durée, température, concentration de protéines etc.).

La figure II donne le déroulement des opérations effectuées en vue de la caractérisation des mannolipides formés enzymatiquement chez *S. pombe*. On indique, en les soulignant, les fractions qui ont été étudiées.

Figure II

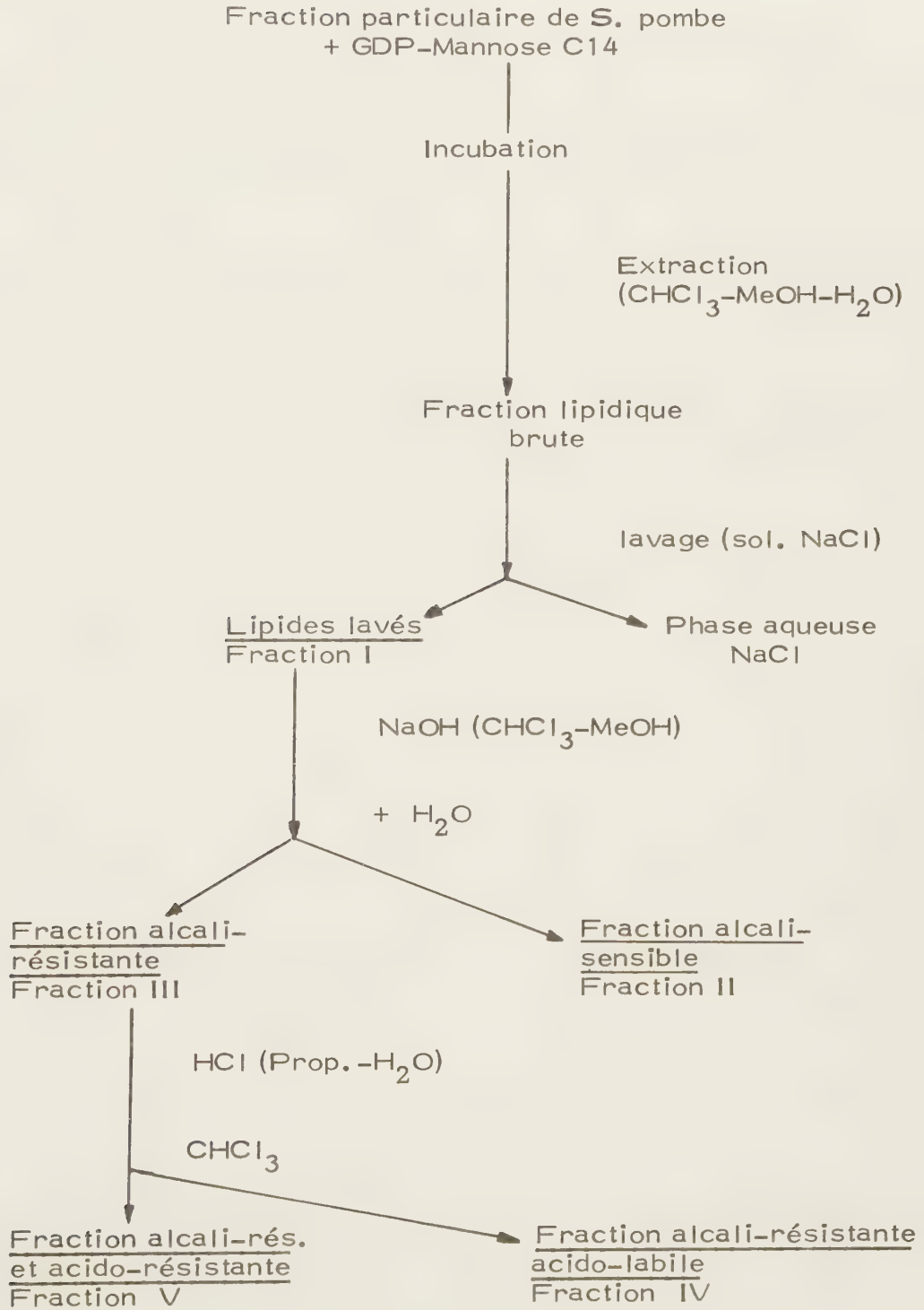


Schéma d'analyse des mannolipides de *S. pombe*

2-2-2-1 Essai de séparation des lipides totaux (Fraction I)

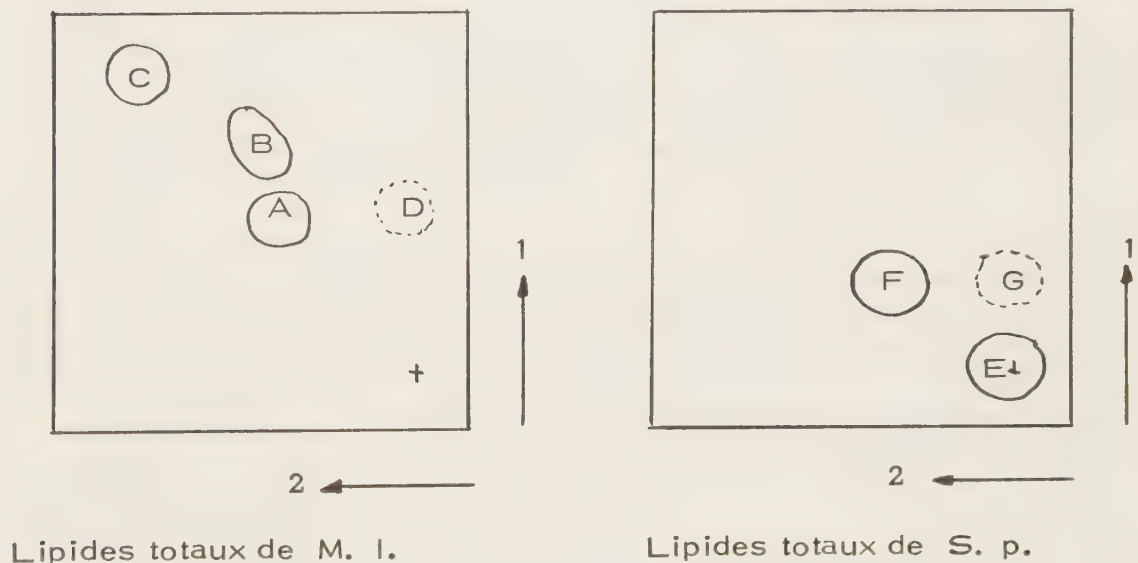
a) Chromatographies bidimensionnelles sur gel de silice

Cette technique donne 3 taches bien distinctes. Des essais d'élu-
tion de ces produits à partir de la silice, par divers solvants plus
ou moins polaires, ont été décevants; il n'a pas été possible de
récupérer plus du 25 % de la radioactivité déposée, le 75 % demeurant
irréversiblement lié à la silice.

Pour tenter de récupérer au maximum la radioactivité fixée dans
la silice, on tente de desacyler le lipide adsorbé, malheureusement
sans résultat, aucune radioactivité n'étant libérée dans ces condi-
tions.

Les mêmes essais de séparation sont effectués sur des manno-
lipides radioactifs de M. lysodeikticus. On observe 4 substances dis-
tinctes, dont deux disparaissent après desacylation alcaline. Ces
dernières sont désignées par "B" et "C" dans la figure III.

Figure III



En ce qui concerne S. pombe, il n'est pas possible de déceler
de différences notables entre les lipides totaux et les lipides résis-
tants à la desacylation. D'autre part, chez M. lysodeikticus, Lennarz
(38-40) décrit 3 lipides dont un seul est insensible aux alcalis; ce
n'est pas le cas dans cette expérience qui présente 4 produits radio-
actifs dont deux insensibles aux alcalis.

De ces résultats, on peut déduire que les manno-
lipides de S. pombe sont différents de ceux de M. lysodeikticus aussi bien dans
leur nombre que par leurs propriétés.

b) Par colonne de DEAE-Cellulose, forme acétate

Le système d'élution est donné dans la partie " matériel et méthodes" (2-1-7-1b).

Cette technique de séparation aurait pu être valable du fait que l'on obtenait une bonne séparation. Malheureusement, les produits récupérés, traités par les alcalis (NaOH), donnent 100% de desacylation. Il semble que les lipides introduits sur la colonne aient subi d'importantes modifications, peut-être à cause de l'acide acétique et du gradient d'acétate d'ammonium utilisés.

La radioactivité récupérée dans l'ensemble des fractions ne représente jamais plus de 50%; ce qui fait que certains lipides restent fixés sur la colonne et que, même avec des solvants d'élution très polaires, il soit impossible de les libérer.

2-2-2-2 Etude des conditions d'hydrolyse alcaline des lipides totaux (Fraction I) de *S. pombe*.

Une des méthodes les plus utilisées dans la chimie d'identification des lipides est la réaction de desacylation. Comme il existe dans la littérature un grand nombre de procédés décrits, il faut déterminer les conditions adaptées aux lipides de *S. pombe*. On obtient alors deux fractions, selon que les produits se retrouvent dans la phase aqueuse ou organique; la première contenant les produits dérivant des lipides sensibles aux alcalis, la seconde réunissant des lipides résistant au traitement.

a) La méthode de Scher et Lennarz (MM 2-1-8a) donne une fraction aqueuse contenant passablement de sels, ce qui rend impossible la chromatographie sur papier. L'élimination de ces sels sur colonne de Dowex, forme pyridinium est inutilisable, du fait qu'une grande quantité du produit marqué se fixe irréversiblement sur la résine.

b) La méthode de Brockerhof par LiOH (MM 2-1-8b) n'est pas non plus satisfaisante; d'une part la déacylation des lipides alcalisensibles n'est pas quantitative, et de plus, elle ne donne pas des résultats reproductibles.

c) La méthode de Dawson et coll. par NaOH/MeOH (MM2-1-8c) donne les meilleurs résultats. Les conditions sont suffisamment douces pour ne pas détruire les lipides qui sont censés résister et donne des pourcentages de desacylation relativement reproductibles et une perte de radioactivité encore acceptable. Les proportions de produits desacylés hydrosolubles sont données dans le tableau V.

Tableau V

Récupération	% desacylable	% non desacylable
65 à 70 %	15 %	85 %

Bilan de la desacylation NaOH/MeOH de la fraction I

Les résultats indiqués sont des moyennes de plusieurs expériences.

2-2-2-3 Etude de la fraction alcali-labile (Fraction II) des lipides totaux de *S. pombe*.

Les produits alcali-sensibles peuvent être rapprochés par leur comportement aux glycéromannolipides décrits par Lennarz (38). Pour faciliter l'identification des lipides de *S. pombe*, il est nécessaire de préparer des substances de comparaison : synthèse de α -mannosyl-glycérol et extraction des glycéromannolipides formés enzymatiquement à partir de préparations acellulaires de *M. lyso-deikticus*.

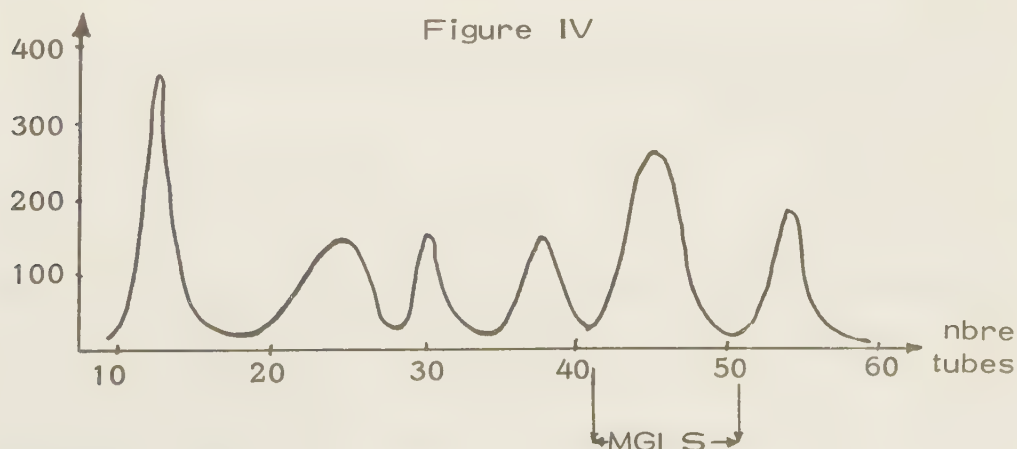
a) Synthèse de l' α -mannosyl-glycérol

La méthode utilisée est celle décrite par Lennarz (38). A 25 ml de glycérol anhydre fraîchement distillé, on ajoute 1,8 gr de D-mannose préalablement séché sous vide poussé pendant une nuit, et 100 mgr de Na_2SO_4 . On fait passer un courant de HCl gazeux dans la solution jusqu'à la concentration finale de 0,1 N environ en HCl. Le ballon est ensuite bien bouché et la solution mise sous agitation magnétique pendant 20 h. à 30° C. On neutralise avec une solution de Na_2CO_3 2 N et on dilue à 60 ml avec de l'eau. On désionise au moyen de résines cationique et anionique et la solution est concentrée à environ 36 ml.

Le produit brut est ensuite fractionné sur colonne de charbon actif 35-50 mesh (Merck) par élution au moyen d'un gradient linéaire d'éthanol de 0 à 33 %.

Si Lennarz, d'après cette méthode, isole l' α -mannosyl-glycérol pur, la séparation obtenue dans notre laboratoire donne plusieurs substances contenant toutes du mannose et du glycérol en plus de grandes quantités de produits initiaux (Figure IV).

UK filtre 66



Fractionnement du mannosyl-glycérol synthétique (MGLS) sur colonne de charbon.

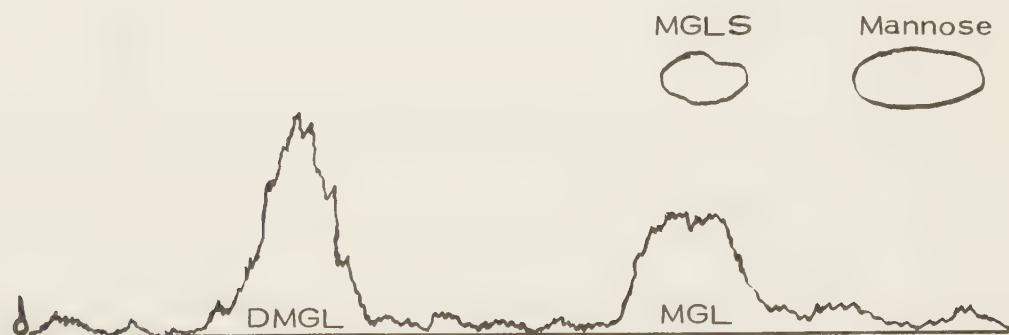
D'autre part, toutes les fractions sont contaminées par du mannose libre qui est éliminé par oxydation à l'hypoiodite et rétention sur résine de Dowex mixte H^+ et OH^- .

La fraction dont les propriétés chromatographiques concordent avec celles décrites par Lennarz (38) pour l' α -mannosyl-glycérol est encore soumise à l'action d'une α -mannosidase de "Jack bean" (68). On met en évidence dans ce cas, par analyse chromatographique en phase gazeuse, la sensibilité du produit à cet enzyme hydrolytique spécifique. La preuve complète d'identité est obtenue par comparaison avec le produit d'hydrolyse de mannoïpides extraits de M. lysodeikticus avec les mêmes méthodes que celles décrites par Lennarz.

b) Isolement des glycéromannoïpides à partir de M. lysodeikticus.

L'incorporation de GDP-Mannose radioactif et l'isolement des lipides se font d'après les méthodes précédemment décrites (MM 2-1-4-2 et 2-1-5 et 6). Les mannoïpides sont ensuite desacylés par NaOH/MeOH et la fraction aqueuse obtenue est alors comparée chromatographiquement avec les produits de synthèse (Figure V).

Figure V



Comparaison du mannosyl-glycérol de synthèse avec les mannoïpides alcali-sensibles de M. lysodeikticus.

Chromatographie Whatman N° 1
Système : n-BuOH- 0,1 N HCl- pyr.
Détection : scanner

DMGL = α -D-mannosyl(1→3)- α -D-mannosyl (1→3) glycérol
 $R_{\text{man}} = 0,36$; $R_{\text{man}} = 0,37$ (38)

MGL = α -D-mannosyl-(1→3)glycérol
 $R_{\text{man}} = 0,82$; $R_{\text{man}} = 0,82$ (38)

MGLS = α -mannosyl-glycérol synthétique
 $R_{\text{man}} = 0,80$

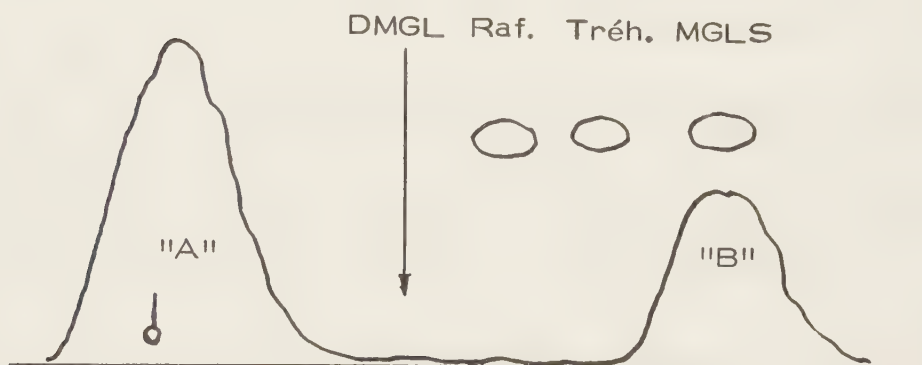
Etant donné l'identité de mannosyl-glycérol de synthèse avec le mannosyl-glycérol de M. lysodeikticus, ce produit synthétique est utilisé comme témoin chromatographique lors de l'étude de la fraction alcali-sensible de S. pombe.

c) Identification des mannoles lipides alcali-sensibles (Fraction II) de S. pombe.

1) Chromatographie sur papier.

La fraction II soumise à la chromatographie sur papier (Whatman N° 1; système : n-BuOH-0, 1 N HCl-Pyr.) montre deux pics bien distincts (Figure VI).

Figure VI



Chromatographie de la fraction II des lipides de S. pombe

Témoins : mannosyl-glycérol synthétique MGLS
tréhalose
raffinose

Le pic "B" est identique au mannosyl-glycérol de synthèse dans 3 systèmes différents de chromatographie. Le tableau VI montre les différents R man. de ce produit, comparés à ceux du mannosyl-glycérol.

Tableau VI

<u>Systèmes chromatographiques</u>	<u>R man "B"</u>	<u>R man MGLS</u>
1-BuOH-Pyr-0, 1 N HCl (50/30/10; v/v/v)	0, 80	0, 82
2-ProOH-H ₂ O (7/3; v/v)	0, 87	0, 88
AcOEt-Pyr-H ₂ O (12/5/4; v/v/v)	0, 90	0, 92

R mannose du pic "B" de la fraction II de S. pombe dans divers solvants.

Les premières chromatographies de cette fraction II ne donnaient pas des R man. caractéristiques pour le pic "B"; ce n'est qu'après adjonction d'une petite quantité de mannosyl-glycérol synthétique comme entraîneur sur la tache de départ que l'on obtient des R man. reproductibles et très voisins de ceux donnés dans la littérature (38).

Ce pic "B", par hydrolyse acide (38), donne du mannose radioactif, ce qui montre qu'il s'agit bien du mannosyl-glycérol et non pas d'un produit de transformation du squelette mannosyle.

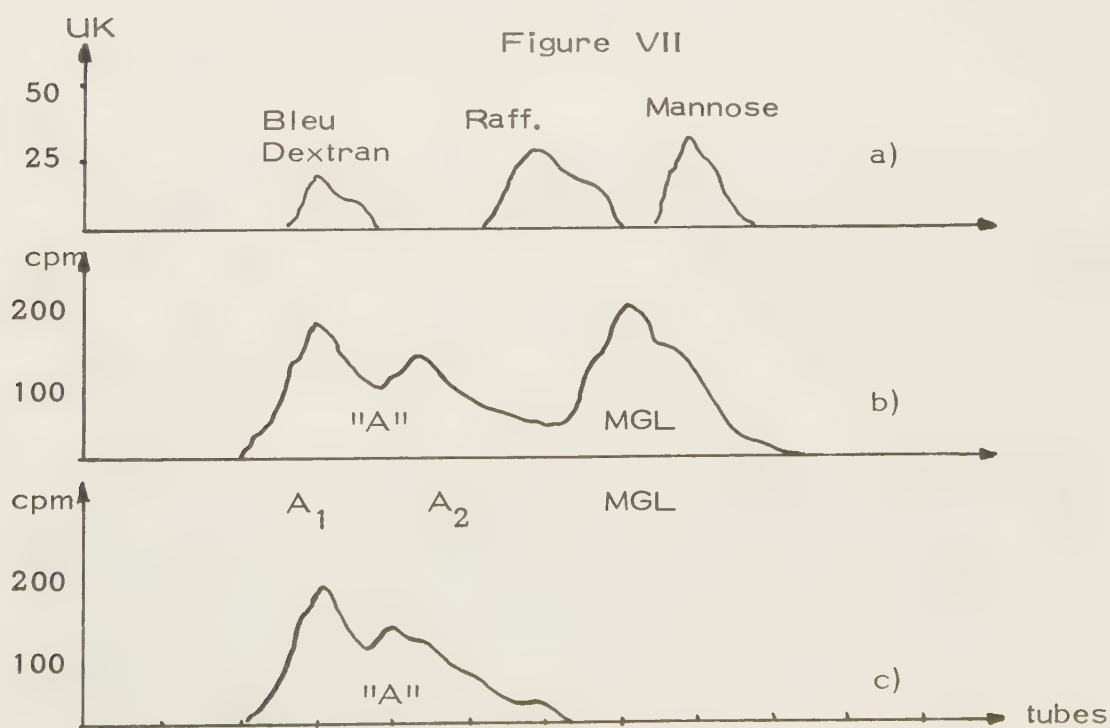
La substance du pic "A" ne migre pas dans aucun des systèmes essayés en chromatographie sur papier. Il doit probablement s'agir d'une substance de haut poids moléculaire. On voit que ce ne peut être ni un di-, ni un trisaccharide d'après les migrations chromatographiques observées pour le raffinose et le tréhalose.

2- Chromatographie sur colonne de Séphadex G 15

Pour essayer de caractériser cette fraction "A", il est nécessaire d'avoir une idée des dimensions moléculaires des produits qui la composent.

La colonne de Séphadex est préalablement calibrée avec une solution de bleu Dextran (Pharmacia), de mannose et de raffinose (MM 2-1-9b).

La figure VII donne la répartition de la radioactivité de la fraction II des lipides de *S. pombe* sur cette colonne.



Répartition des produits radioactifs de la fraction II de *S. pombe* sur Séphadex G 15

a = standards

b = fraction II de *S. pombe*

c = pic "A" de la fraction II de *S. pombe*

MGL = mannosyl-glycérol

Quand on fractionne le pic "A" sur Séphadex G 15, c'est-à-dire la fraction II dont on a éliminé le mannosyl-glycérol, on observe le profil de la figure VII c, dont le pic le plus retardé a complètement disparu. Ce pic est déjà identifié comme étant du mannosyl-glycérol (pic "B" de la chromatographie sur papier). Ses dimensions, très légèrement supérieures au mannose, font qu'il est élué de la colonne peu avant ce dernier.

Le reste de la chromatographie représente le pic "A" de la chromatographie sur papier, qui est composé d'au moins deux substances marquées, dont les poids moléculaires sont supérieurs au raffinose. Comme le volume d'exclusion du Séphadex G 15 est < 1500 , les oligosaccharides marqués sont des chaînes ayant plus de 4 restes glycosidiques. Vu l'étalement des pics, il doit s'agir de deux familles d'oligosaccharides dont la nature des unités et l'enchaînement ne sont pas encore connus.

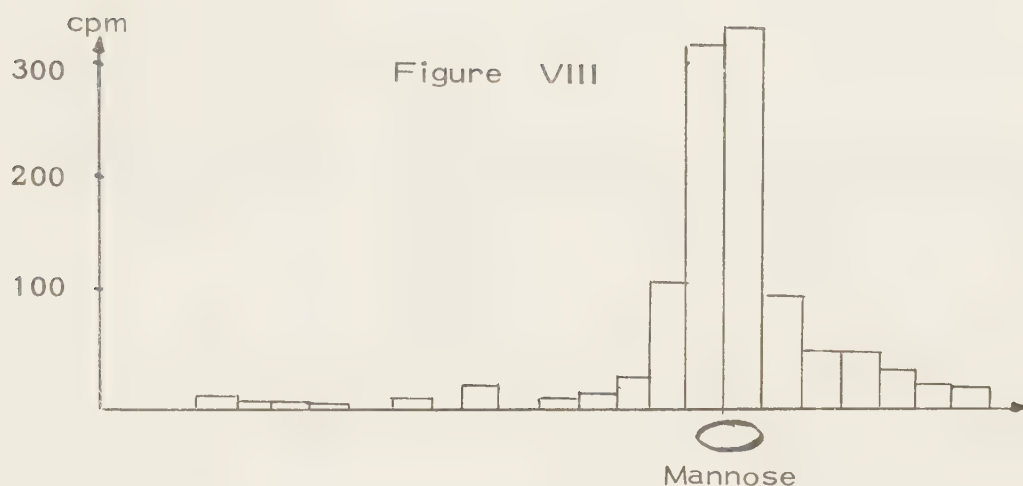
Chacune des trois fractions : A1, A2 et MGL est soumise à une hydrolyse à l'acide trifluoroacétique (MM 2-1-11). Les produits d'hydrolyse sont passés à la chromatographie gazeuse sous forme de leurs dérivés triméthylsilés. Les sucres décelés par cette méthode (glucose, galactose et inositol) représentent, non pas les marquages radioactifs, mais bien l'ensemble des produits présents. La sensibilité de cette méthode, bien que très grande, n'est pas capable de déceler un produit marqué qui, dans les conditions d'expérience, ne touche que le mannose.

2-2-2-4 Etude de la fraction insensible aux alcalis (Fraction III)

a) Acido labilité de la fraction III de *S. pombe*

Parmi les lipides alcali-résistants décrits dans la littérature, il est souvent fait mention de dérivés mannosyl-phosphate-polyprénols qui sont des intermédiaires dans la synthèse des mannanes. Ces dérivés sont facilement caractérisés par leur extrême labilité en milieu acide.

Par traitement avec $\text{HCl } 5 \cdot 10^{-3} \text{ N}$, 5 min. à 100° C . de cette fraction III, on observe 55% d'hydrolyse tandis que les 45 autres pourcents ne sont pas touchés par cette réaction. Les produits hydrosolubles résultant de cette réaction sont séparés par chromatographie sur papier Whatman N°1 (n-BuOH-0,1 N HCl-Pyr.) (50/10/30; v/v/v). Etant donné la très faible radioactivité, il n'a pas été possible de procéder simplement à un "scanning"; il a fallu découper le chromatogramme et mesurer l'activité par scintillation liquide (Figure VIII).

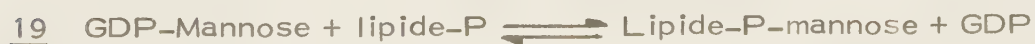


Chromatographie de la fraction IV de *S. pombe*

La figure VIII montre la présence d'un pic de mannose uniquement après traitement avec HCl 0,005 N. Lennarz (39) obtient également du mannose avec HCl 0,01 N, 10 min. à 100° C. et un petit pourcentage de mannose-1-P si l'hydrolyse ne dure qu'une minute.

b) Réversibilité de la réaction de formation du dérivé mannosyl-phosphoryl-polyprénol.

La possibilité de réversibilité de formation des mannosyl-phosphoryl-polyprénols donne de précieuses indications sur le type de réaction. Pour examiner cette possibilité, on effectue l'expérience en deux temps. Tout d'abord, une préparation des mannosyl-lipides radioactifs résistants aux alcalis (Fraction III), suivie d'une incubation de ces lipides avec la fraction particulaire de *S. pombe*. On effectue la réaction en présence de GDP (2 mM); dans ce cas, la direction de la réaction doit être inversée, avec reformation de GDP-Mannose radioactif (Formule 19).



Les mannosyl-lipides marqués sont homogénéisés par ultrasons (20 Kc/sec) en présence de 0,1 % de Triton-X-100. Après incubation de 15 min., on extrait les lipides de la façon habituelle et la radioactivité des phases, organique et aqueuse, est déterminée. Les résultats sont donnés dans le tableau VII.

Tableau VII

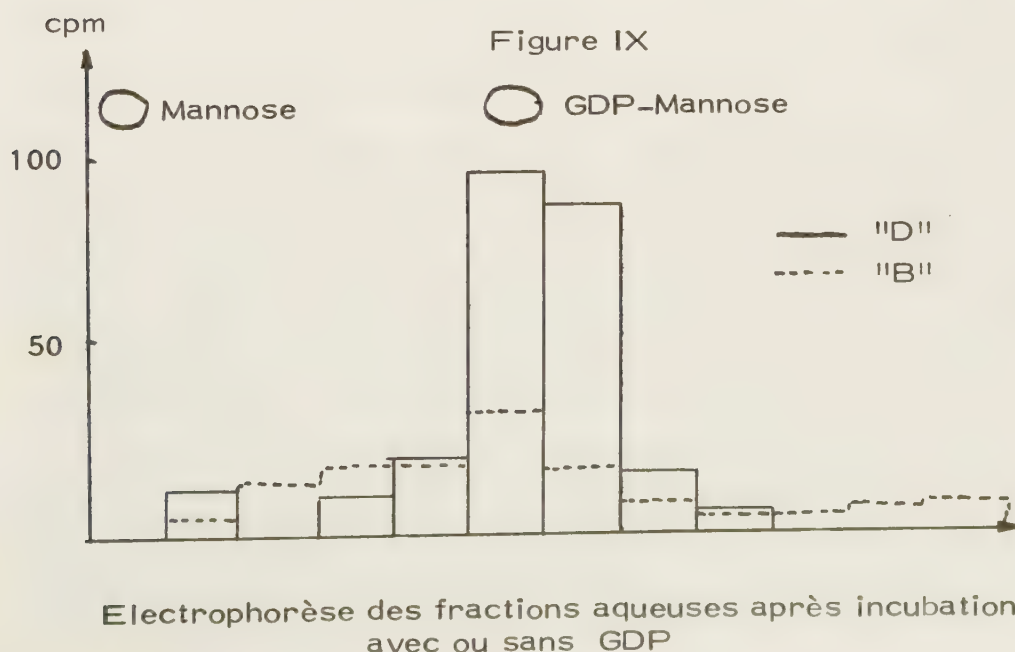
<u>Expérience</u>	<u>cpm phase org.</u>	<u>cpm phase aqueuse</u>
A	2550	10
B	2100	100
C	2450	50
D	1450	850

Incubation en présence ou absence de GDP

- A = témoin sans GDP et sans enzyme, avec lipides radioactifs
B = témoin sans GDP, avec enzyme et lipides radioactifs
C = témoin sans GDP, avec enzyme préalablement inactivé par adjonction de 5 ml de CHCl_3 -MeOH (2/1) et lipides radioactifs.
D = expérience avec GDP, enzyme et lipides radioactifs.

En présence de GDP (expérience "D"), la radioactivité des lipides (phase organique) a fortement diminué et celle trouvée dans la phase aqueuse compense approximativement cette diminution. Comparée aux témoins, on constate aussi, en absence de GDP exogène, une légère diminution de la radioactivité lipidique accompagnée d'une faible augmentation dans la phase aqueuse (Tableau VII, expérience "B"); ceci peut être dû à des traces de GDP endogène présent dans le milieu d'incubation.

Les phases aqueuses des essais "B" et "D" sont étudiées par électrophorèse à haute tension sur papier Whatman N° 1 avec du mannose et du GDP-Mannose comme témoins. Les résultats sont reportés sur la figure IX.



Les essais "A" et "C" ne sont pas analysés du fait de leur trop faible radioactivité.

On peut déduire, qu'en présence de GDP et de mannoles lipides marqués (Fraction III), un extrait particulière de S. pombe est capable de régénérer du GDP-Mannose radioactif. La réversibilité de la réaction N° 19 est donc confirmée.

c) Essai pour mettre en évidence le rôle d'intermédiaire dans la synthèse des mannanes de la fraction III.

Plusieurs auteurs attribuent à ces glycolipides dérivés des phospho-polyisoprènes un rôle d'activateur final dans la chaîne de réactions aboutissant à la formation des polysaccharides.

Les lipides radioactifs, comme dans le cas de la réversibilité, sont incubés avec la fraction particulière de S. pombe en présence de ions Mn^{++} . Le mélange réactionnel est déposé sur papier Whatman N° 1 et soumis à une électrophorèse en tampon acétate pour éliminer les produits porteurs de charges. La zone de l'origine est extraite par de l'EtOH 55% et traitée par les solvants organiques pour éliminer les produits de faible poids moléculaire et les lipides résiduels. La radioactivité restant sur le papier représente l'incorporation dans les polymères (Tableau VIII).

Tableau VIII

	<u>cpm lipidiques</u> <u>introduits</u>	<u>cpm origine</u>	<u>%</u> <u>incorpor.</u>
Témoin	2500	0	0 %
Expérience	2500	40	1,6 %

Incorporation de Mannose C14 dans une fraction non lipidique

Le témoin contient toutes les solutions du milieu d'incubation, mais l'enzyme est préalablement inactivé.

On n'observe qu'une très faible incorporation dans la fraction non lipidique par rapport au témoin. Cette radioactivité ne peut pas provenir de produits de décomposition tels que mannose et mannose-phosphate, ceux-ci ayant été éliminés par lavage dans l'EtOH 55%; il ne s'agit pas non plus des produits de départ, les lipides à mannose marqué, puisqu'ils sont extraits par le mélange $CHCl_3$ -MeOH- H_2O (65/25/4) pendant 1 h. Cette incorporation de 1,6% doit donc bien représenter la portion de reste mannosyle transféré à partir du lipide sur les polymères.

Dans l'expérience que l'on vient de décrire, les lipides utilisés représentent un mélange de deux lipides en proportion environ égale. En chromatographiant la fraction lipidique III sur colonne de silice et en éluant avec $CHCl_3$ -MeOH- H_2O (65/25/4), il est possible de séparer un lipide 100% acido-labile (Fraction IV) tandis que l'autre (Fraction V) est retenu quantitativement sur la silice.

C'est sur cette fraction IV que l'expérience décrite sous "c" est répétée. Les résultats sont donnés dans le tableau IX.

Tableau IX

	<u>cpm lipidiques</u> <u>introduits</u>	<u>cpm origine</u>	<u>%</u> <u>incorpor.</u>
Témoin	3000	0	0 %
Expérience	3000	100	3,3 %

Incorporation de Mannose C14 dans une fraction non lipidique

En supposant que seul le lipide acido-sensible est responsable de l'incorporation dans les polysaccharides, et en sachant qu'il représente les 55% de la fraction III, on peut faire un calcul pour estimer la correspondance des pourcentages d'incorporation dans les deux expériences.

Après avoir rapporté les 3,3% obtenus ci-dessus au 55% du lipide de la fraction III utilisée telle quelle dans l'expérience précédente, on obtient 1,8% comparé au 1,6% du tableau VIII.

Il semblerait donc que c'est ce lipide acido-labile de la fraction III qui interviendrait dans le transfert du reste mannosyle sur la fraction polysaccharidique. Il faut faire remarquer que cette incorporation est très faible par rapport à la radioactivité mise en oeuvre.

2-2-5 Essai de solubilisation des enzymes de *S. pombe*

Avec des réactions enzymatiques du type de celles décrites chez *S. pombe*, où l'on voit qu'une fraction particulière catalyse le transfert de reste mannosyle sur au moins 4 lipides différents, la séparation des diverses activités enzymatiques devrait permettre l'étude de chacun des systèmes. Comme les enzymes sont tous de nature particulière (microsomes), il est nécessaire de solubiliser les enzymes avant de pouvoir procéder à des séparations, en espérant d'une part, que la solubilisation soit différentielle et d'autre part, que certains des accepteurs qui ont toujours accompagné les enzymes, ne soient plus accessibles.

En s'inspirant des travaux de Bosman (10), l'homogénat complet de *S. pombe* est traité par une solution de Triton-X-100 à 0,1%. Le matériel particulière est sédimenté par centrifugation à 90.000 x g. Le surnageant qui représente les enzymes solubles et ceux qui ont été solubilisés est concentré, soit par dialyse inverse contre du polyvinylpyrrolidone, soit par lyophilisation. On mesure alors l'incorporation du mannose marqué dans les lipides et dans les polysaccharides par la microméthode en capillaires.

Dans le cas des préparations concentrées par dialyse inverse, on note que presque toute la radioactivité se retrouve dans la fraction soluble dans l'EtOH 55% et a pu être identifié, par chromatographie sur papier, comme étant du mannose. Ceci laisse à supposer

que les enzymes responsables de la biosynthèse des manno lipides sont inactivés par cette dialyse, ou par perte des accepteurs spécifiques indispensables aux réactions enzymatiques. Il faut ajouter que les enzymes cytoplasmiques qui dégradent le GDP-Mannose sont aussi présents dans cette préparation.

Par contre, dans le cas de la lyophilisation, on obtient des enzymes fonctionnels, mais dont l'activité est plus faible que celle des enzymes particulières (Tableau X).

Tableau X

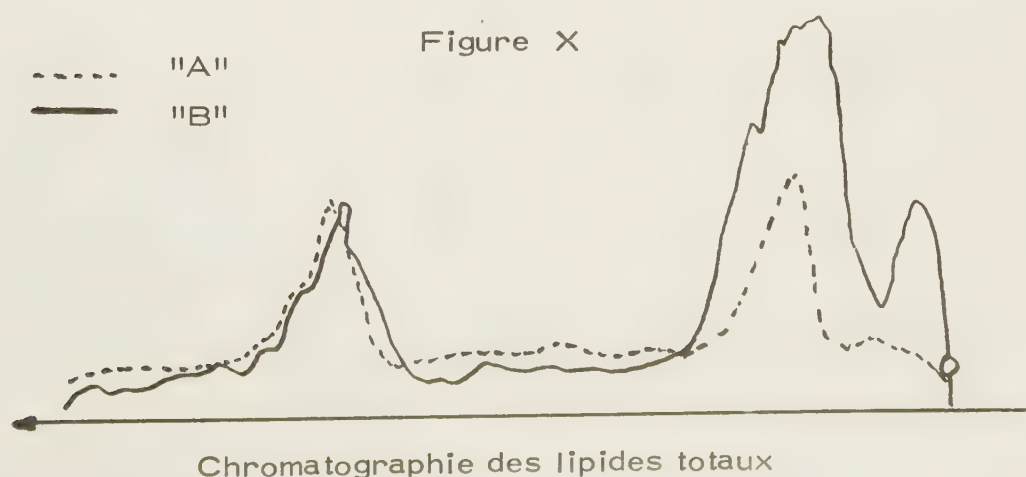
	<u>cpm/mgr protéine</u>	<u>cpm/mgr prot.</u>	<u>%radioac.</u>
	<u>Fract. origine</u>	<u>Fract. lipides</u>	<u>Fract. lip.</u>
Enzyme Triton lyophilisé	95	228	67%
Enzyme particulière	1270	725	35%

Incorporation de GDP-Mannose en présence d'enzymes particulières et d'enzymes extraits par le Triton-X-100

On remarque que l'incorporation de mannose dans les lipides d'une préparation enzymatique solubilisée par le Triton et lyophilisée est environ 3 fois plus faible que celle d'une préparation particulière.

Un fait intéressant à noter est l'inversion des proportions entre les fractions, lipidique et non lipidique quand on solubilise les enzymes. L'extraction par le Triton semblerait plutôt solubiliser les enzymes responsables de l'incorporation lipidique.

De plus, il faut examiner si l'extraction par le Triton est sélective en ce qui concerne certains enzymes responsables de la biosynthèse des manno lipides. Dans ce but, les deux types de préparations sont incubées avec du GDP-Mannose radioactif et les extraits lipidiques sont comparés par chromatographie sur plaque de silice (Figure X).



A = à partir d'un extrait enzymatique Triton lyophilisé.
B = à partir d'un extrait enzymatique particulaire.

Les "scanning" des chromatogrammes des lipides "A" et "B" montrent des profils très semblables. Ceci indique que, si les enzymes particulaires sont extraits par le Triton-X-100, ils ne le sont que partiellement et surtout d'une façon non spécifique. Si l'on remplace la solution de Triton par une solution de Brij 58 à 2%, on n'observe que peu de différence dans la nature des lipides formés.

2-2-6 Séparation des enzymes et des accepteurs lipidiques

En vue de séparer les accepteurs lipidiques des enzymes responsables de la synthèse des manno- et des fucolipides, Bosman (10) procède à une précipitation acétonique. Cette méthode est appliquée aux préparations de S. pombe solubilisées par le Triton-X-100.

200 mgr d'extrait lyophilisé (Triton) de S. pombe sont dissous dans 2 ml d'eau et refroidis dans la glace; on ajoute lentement 10 ml d'acétone préalablement refroidis à -10°. Le précipité obtenu est filtré sur Büchner, lavé avec une petite quantité d'acétone froid et conservé à -25° C. (=précipité acétonique). Le filtrat est évaporé sous courant d'azote (= filtrat acétonique).

Au moment de l'utilisation, le "précipité acétonique" et le "filtrat acétonique" sont tous deux repris par 1 ml d'eau et conservés dans la glace.

Pour déterminer si la précipitation acétonique est à même de séparer les accepteurs lipidiques, on incube les deux fractions en présence de GDP-Mannose marqué et de ions Mn^{++} . Les incubations se font dans des petits tubes pendant 30 min. à 30° C. La réaction est arrêtée par congélation rapide à -25° C. et le produit est ensuite traité comme dans la méthode des capillaires (MM 2-1-15). Les résultats sont donnés dans le tableau XI.

Tableau XI

<u>Expérience</u>	<u>cpm non lipidique</u>	<u>cpm lipidique</u>
Précipité acétonique	130	190
+ GDP-Mannose		
Filtrat acétonique	30	80
+ GDP-Mannose		
Précipité acétonique	200	1000
Filtrat acétonique		
+ GDP-Mannose		

Incubation d'enzyme précipité par l'acétone avec adjonction d'accepteurs lipidiques

Chaque valeur ci-dessus est la moyenne de deux essais.

On peut déduire du tableau XI que la précipitation acétonique permet de séparer les accepteurs lipidiques des enzymes responsables de la synthèse des mannosides. En effet, la radioactivité dans les lipides, en présence d'accepteurs lipidiques, est plus de 5 fois supérieure à celle du "précipité acétonique" sans adjonction des accepteurs, et dix fois plus élevée que dans le "filtrat acétonique". Il est d'autre part intéressant de noter qu'en présence d'accepteurs lipidiques, la radioactivité dans la fraction polymère n'est guère plus élevée que dans l'essai effectué avec le "précipité acétonique" seul.

Cette précipitation acétonique sépare bien les accepteurs lipidiques et les enzymes; mais l'essai effectué sur le "précipité acétonique" montre bien qu'il reste une certaine quantité d'accepteurs dans le précipité; ceux-ci pourraient peut-être être extraits par une deuxième précipitation.

D I S C U S S I O N

Alors que les mannoles de Micrococcus lysodeikticus ont été relativement bien décrits, ceux des levures ont été étudiés moins systématiquement. Une des premières difficultés rencontrées dans l'étude de la biosynthèse des mannoles de Schizosaccharomyces pombe est la faible incorporation de mannose dans les glycolipides.

En effet, comparées aux observations de Lennarz (38), avec des préparations de Micrococcus lysodeikticus, qui note un transfert de 7 nmoles de mannose /mgr de protéine, les incorporations optimales obtenues avec des préparations de S. pombe sont de 0,3 nmoles de mannose /mgr de protéine; c'est-à-dire environ 20 fois moins que chez la bactérie (Tableau IV). Il est évident que, dans ces conditions, la seule méthode utilisable soit celle des traceurs radioactifs puisqu'avec un niveau d'incorporation aussi bas, il est aléatoire de pouvoir détecter et identifier les glycolipides non radioactifs formés pendant les réactions enzymatiques. Il faut faire remarquer qu'une autre limitation réside dans les quantités de cellules qu'il est possible de cultiver et des volumes qu'il est possible de manipuler pour préparer les enzymes : broyage des cellules, centrifugation etc. Ainsi, à partir de quatre litres de culture en phase logarithmique, les cellules représentent environ 18 gr (poids humide), la fraction microsomale seulement 150 mgr de protéine, c'est-à-dire une proportion infime.

Les moyens à mettre en oeuvre pour isoler des lipides chimiquement purs, en quantité suffisante sont hors de proportion avec les moyens à disposition. Par exemple, pour extraire le dimannosyl-diglycéride à partir de M. lysodeikticus (lipide qui représente la majeure partie des graisses), Lennarz (38) est obligé de partir de 100 gr de masse cellulaire fraîche pour extraire 1,1 gr de lipides totaux, dont il isole au maximum 150 mgr de lipide purifié. Chez S. pombe, les lipides étant beaucoup plus complexes et en quantité très faible, les volumes de culture représenteraient plusieurs centaines de litres, ce qui est impossible dans nos conditions de travail.

Il a donc fallu se restreindre à l'étude de la biosynthèse par marquage des lipides au moyen du mannose radioactif.

La seconde difficulté est de nature chromatographique. De nombreux essais de séparation, que ce soit sur colonnes de silice ou DEAE-Cellulose ou sur couches épaisses de silicagel et, l'impossibilité d'autre part d'éluer ces lipides avec des rendements raisonnables, n'ont pas donné de résultats satisfaisants. On observe que, dans le cas d'élution avec des solvants polaires comme des mélanges de chloroforme et de méthanol ou de pyridine et butanol, les rendements de récupération représentent rarement plus de 50% de la radioactivité mise en jeu. Plusieurs auteurs recommandent des solvants contenant de l'acide acétique; dans le cas des mannoles de S. pombe, on constate malheureusement des altérations profondes qui ont fait abandonner cette technique.

La réaction pourtant classique de desacylation alcaline a causé bien des problèmes. Les conditions expérimentales mises au point par Brockerhoff pour les phospholipides (63) ou par Lennarz (39) pour isoler le mannosyl-1-phosphoryl-polyprénol provoquent des dégradations chez certains lipides de S. pombe, si bien qu'il a fallu chercher des conditions spécialement adaptées à cette catégorie de substances.

La méthode retenue (MM 2-1-8c) donne pour le mélange de lipides formés enzymatiquement 15 % de desacylation, le 85 % restant à l'état de lipides non transformés (Tableau V). Ces valeurs sont très voisines de celles que Bretthauer observe pour les lipides d'une autre levure : Hansenula holstii, (18) où 80 % des lipides résistent à l'action de NaOH dans un mélange de CHCl_3 -MeOH.

En plus de l'incorporation de mannose radioactif dans les fractions lipidiques, on observe, dans les préparations enzymatiques de S. pombe, une fixation du même sucre sur des macromolécules (appelées "fraction non lipidique"), très probablement polysaccharidiques, mais dont la nature n'est pas déterminée. La radioactivité insoluble après extraction des lipides et des produits de faible poids moléculaire se laisse extraire, comme les mannanes, par des alcalis dilués; mais à leur différence, elle ne se laisse pas précipiter par les sels de cuivre, si bien qu'on peut exclure la formation de mannanes tels qu'on les rencontre dans les parois. Cabib (37) montre que des homogénats de S. cerevisiae catalysent la fixation du mannose à partir de GDP-mannose sur des polysaccharides du type correspondant aux mannanes, ce qui représente une différence fondamentale avec ce qui est trouvé chez S. pombe.

L'incorporation de mannose radioactif dans les lipides et les polymères de S. pombe est augmentée par la présence de cations divalents et plus particulièrement de Mn^{++} à la concentration de 3 mM; mais la présence de ions divalents n'est pas indispensable puisqu'on observe quand même une incorporation lipidique de 37 % et non lipidique de 59 % par rapport à l'expérience effectuée en présence de Mn^{++} (Tableau III). Ces résultats sont nettement différents de ceux trouvés par Ankel et Schutzbach (31) qui n'obtiennent, chez Cryptococcus laurentii, aucune incorporation, ni lipidique, ni dans les polymères, sans adjonction de ions Mn^{++} .

Tanner (25) montre aussi que la synthèse des mannanes est dépendante des ions Mn^{++} et que la biosynthèse de l'intermédiaire lipidique (un C₅₅ polyisoprénol à liaison pyrophosphate) dépend essentiellement des ions Mg^{++} ; en ajoutant des ions Mn^{++} en plus de Mg^{++} , cet auteur observe une augmentation de la synthèse des mannanes et une diminution de la concentration du lipide intermédiaire.

Dans le cas de S. pombe, plusieurs ions divalents ont été essayés et l'activité transférase est maximale avec le Mn^{++} tandis que le Mg^{++} ne représente que les 45 %. Quant aux autres ions, ils montrent les activités relatives suivantes : Mn^{++} 1,0; Cd^{++} 0,84; Co^{++} 0,57; Fe^{++} 0,38; Zn^{++} 0,1; Ca^{++} 0,05.

En étudiant la cinétique de la réaction d'incorporation du mannose C14 dans la fraction lipidique et non lipidique de S. pombe, on observe que la courbe des lipides accuse une diminution après 40 min. d'incubation, ce qui n'est pas le cas de la fraction non lipidique (Figure I). Cette diminution lipidique suggère une cinétique d'intermédiaire intervenant dans la synthèse des polysaccharides. Un tel mécanisme est bien décrit chez M. lysodeikticus par Scher et collaborateurs (39). Ces auteurs montrent une incorporation lipidique très rapide qui diminue déjà après 10 min. d'incubation, alors que la formation des mannanes se fait avec un certain retard par rapport à celle des lipides.

Ankel et Schutzbach (31) rapportent que, dans le cas de Cryptococcus laurentii, une autre levure, la cinétique d'incorporation du mannose dans la fraction lipidique ne correspond pas à celle d'un intermédiaire, ce qu'ils ont d'ailleurs démontré par l'impossibilité de transférer du mannose sur les polysaccharides à partir des lipides. Le comportement de ce lipide au traitement acide ne correspond pas aux caractéristiques décrites pour les dérivés glycosidiques des polyprénols phosphates qui sont considérés actuellement comme les activateurs finals dans la biosynthèse des polysaccharides.

Chez S. pombe, la situation est plus complexe. La cinétique observée est globale, c'est-à-dire que les mesures de radioactivité dans la fraction lipidique représentent la somme des lipides formés. Comme le lipide, supposé être un intermédiaire dans la synthèse des polysaccharides, n'est pas en proportion largement prépondérante par rapport aux autres, la forme de la courbe ne peut pas donner des renseignements définitifs sur la séquence des événements.

Les lipides de S. pombe se séparent en trois taches distinctes à la chromatographie bidimensionnelle en couche mince (Figure III). Par comparaison avec les produits extraits à partir de M. lysodeikticus, on peut dire qu'ils sont nettement différents par leur migration chromatographique et par leur comportement chimique. En effet, par desacylation des mannosyl-lipides de M. lysodeikticus, on observe la disparition de deux taches radioactives (Figure III : taches "B" et "C") qui correspondent aux mono- et dimannosyl-diglycérides (les produits de desacylation de la fraction aqueuse ayant été identifiés par chromatographie).

Par contre, il n'est pas possible d'observer une diminution du nombre de taches sur le chromatogramme après desacylation des lipides de S. pombe. Il est évident que la séparation obtenue par chromatographie bidimensionnelle n'a pas, dans le cas de ces lipides, de pouvoir séparateur suffisant et que certaines taches peuvent représenter la superposition de plusieurs lipides.

Les expériences de biosynthèse des mannosyl-lipides de M. lysodeikticus ont été reprises avec les techniques utilisées pour S. pombe. A la différence de Lennarz (38) qui indique la présence de trois mannosyl-lipides (mannosyl-diglycéride, dimannosyl-diglycéride

et mannosyl-1-phosphoryl-polyisoprénol) par chromatographie bidimensionnelle, on trouve quatre lipides radioactifs, dont trois sont en quantités importantes. La faible quantité du quatrième lipide ne permet pas encore une analyse de sa structure, bien qu'on ne puisse pas exclure un produit de dégradation d'un des lipides majeurs formé pendant les processus d'extraction et de purification.

Lennarz mentionne que le mannosyl-phosphoryl-polyisoprénol est en faible quantité par rapport aux deux mannosyl-diglycérides; dans notre laboratoire, il est détecté sur M. lysodeikticus en quantité au moins équivalente aux autres mannolipides. Cette différence de rendement peut s'expliquer facilement par l'utilisation de l'Eaton Press pour la préparation de l'homogénat qui - on l'a vu avec les enzymes de S. pombe - préserve mieux l'intégrité des enzymes alors qu'avec la French Press, on constate, malgré toutes les précautions, un échauffement qui peut provoquer certaines dénaturations.

Après desacylation alcaline des lipides totaux de S. pombe, on note l'apparition, dans la phase aqueuse, de α -mannosyl-glycérol qui est identifié par chromatographie. On met aussi en évidence une fraction d'un poids moléculaire élevé. Par filtration sur gel de Séphadex G 15 (Figure VII) de l'ensemble des produits de desacylation, on constate que la radioactivité se retrouve dans deux zones. Celle qui est la plus retardée correspond au mannosyl-glycérol et l'autre est répartie sur un nombre de fractions dont les positions, comparées à celles du tréhalose et du raffinose, indiquent qu'il s'agit d'un mélange de substances dont les poids moléculaires sont étalés mais de toutes façons supérieurs à ceux des trisaccharides.

Il n'est pas possible de détecter chez S. pombe la présence de dimannosyl-diglycéride.

Ces résultats présentent une différence importante avec ce qui est décrit chez M. lysodeikticus, où les seuls produits de desacylation formés sont le mannosyl-glycérol et le dimannosyl-diglycérol (38). Chez cette bactérie, il semble que le mannosyl-diglycéride ne soit qu'un intermédiaire dans la formation du dérivé dimannosylé; en effet dans la bactérie intacte, seul le second existe en concentration appréciable. Par réaction "in vitro", l'équilibre entre les deux étapes est modifié si bien qu'on trouve environ 40% pour le mannosyl-diglycéride contre 60% pour le dimannosyl-diglycéride (Figure V).

Pour revenir aux produits de hauts poids moléculaires de S. pombe, les fractions sont réunies (Figure VII) et soumises à l'hydrolyse acide. La recherche de sucre est effectuée par gaz chromatographie de leurs dérivés silylés. Certaines fractions sont très complexes et contiennent en plus du mannose, du glucose, du galactose et de l'inositol. Le fractionnement effectué pour obtenir ces substances est insuffisant pour admettre la présence d'une seule catégorie de molécules, si bien qu'il est impossible de définir si les glucose, galactose et inositol appartiennent à l'entité sur

laquelle est fixé le mannose, ou plutôt s'il s'agit de la superposition avec des oligosaccharides provenant de glycolipides qui auraient accompagné la substance marquée pendant les processus de desacylation et de purification.

Sur la fonction de ces lipides oligosaccharidiques, il est difficile de se prononcer. Plusieurs suggestions s'imposent : par exemple, par leur chaîne hydrophile importante, un rôle structural dans la membrane, ou un rôle dans la synthèse des hétéropolysaccharides. Dans ce dernier cas, plusieurs schémas peuvent être envisagés :

a) le mannosyl-diglycéride serait un précurseur dans l'allongement de la chaîne oligosaccharidique; mais ceci impliquerait l'addition simultanée d'un groupe d'au moins trois sucres, puisqu'il est impossible de détecter les dérivés di- et trisaccharidiques qui devraient obligatoirement exister. Ceci exclut aussi une simple polymérisation de restes mannosyles. Ce mécanisme semble peu probable, car il est très rare dans la nature de voir l'addition, sur un accepteur, d'un bloc formé de trois unités glycosidiques.

b) la formation du mannosyl-glycéride serait indépendante de celle des lipides oligosaccharidiques. Dans ce cas, l'addition du reste mannosyle se ferait sur un lipide porteur d'une chaîne ayant déjà au moins trois unités de sucres sur laquelle le mannose serait ajouté. Un allongement ultérieur par du mannose ou par d'autres sucres donne alors les produits de poids moléculaire supérieur.

Ce point extrêmement important mériterait une étude approfondie avec des quantités de matériel radioactif nettement supérieures et avec l'utilisation d'autres précurseurs, par exemple : l'UDP-glucose et l'UDP-galactose.

Pour la présence de myo-inositol, les seuls lipides décrits dans la littérature, sensibles à la desacylation alcaline ménagée et contenant à la fois du mannose et le cyclitol, sont ceux qui ont été extraits des Mycobactéries (28-29) (Formule 11). Dans le cas des expériences faites avec S. pombe, la purification et les séparations des substances ne permettent pas de définir la relation entre le mannose et la présence du cyclitol.

En plus des lipides alcali-sensibles, on décèle chez S. pombe deux lipides résistants aux alcalis.

Le premier s'apparente par ses propriétés chimiques et biochimiques aux dérivés polyisopréniques décrits par plusieurs auteurs comme intermédiaires dans la synthèse des mannanes. La principale caractéristique est l'extrême labilité en milieu acide. Le mannose marqué est libéré à 100 % par un traitement à 100° C. dans HCl 0,005 N en 5 min. Dans ces conditions les liaisons glycosidiques ne sont pas hydrolysées. Les dérivés polypréniques sont liés au sucre par une liaison phosphodiester (25 et 40) et dans certains cas par un pont pyrophosphate (54 et 63). Il semble que les lipides ayant une liaison diester phosphate soient fréquents chez

les levures (25) et les bactéries, (40) étant impliqués dans la synthèse des mannanes. Par contre les dérivés du type pyrophosphate sont en relation avec la biosynthèse des peptidoglycanes (54) et les O-antigènes chez Salmonella (69). Il n'y a que l'analyse directe du lipide parfaitement purifié, par la détermination du rapport molaire phosphate/sucre, qui permette de définir sans ambiguïté le mode de liaison du sucre.

Un moyen détourné est l'étude de la réversibilité de la réaction: GDP-Mannose + accepteur lipidique $\rightleftharpoons$ accepteur lipidique-sucre + GDP sous l'action de GMP ou GDP en présence du lipide radioactif et de la préparation enzymatique. L'expérience faite avec le lipide purifié montre que, par addition de GDP, il y a formation évidente de GDP-Mannose radioactif. Il semble donc que la structure de ce lipide corresponde à celle d'un mannosyl-phosphoryl-polyprénol et non pas à celle d'un dérivé pyrophosphorylé (Figure IX).

Le rôle attribué généralement à ces composés, on l'a vu, est celui d'activateur final dans la synthèse des polysaccharides à mannose. En incubant le lipide radioactif purifié avec les préparations particulières de S. pombe, on trouve un transfert relativement faible sur des produits non lipidiques de haut poids moléculaire (Tableau VIII et IX). Le faible rendement d'incorporation peut être attribué à la présence du détergent (Triton-X-100) nécessaire à la dispersion du lipide dans la phase aqueuse. Bretthauer et Irwin (18) ont même décrit une inhibition produite par le même détergent en ce qui concerne le transfert du mannose sur les polysaccharides à partir du dérivé isoprénique. Il faut ajouter que des relations stériques étroites existent pour ces enzymes et que les substrats doivent se trouver dans des états physiques et de localisation très précis pour être utilisables et subir les transformations enzymatiques.

On a essayé d'exalter la synthèse du dérivé polyprénique par adjonction de ficaprénil (extrait à partir de Ficus Elastica) comme précurseur. On ne note aucune augmentation de radioactivité dans le lipide, même en présence d'ATP en supposant la participation d'une kinase. L'absence d'activation peut tout aussi bien provenir d'une trop grande spécificité de la kinase et de la pyrophosphorylase que de l'inactivation de la kinase elle-même dans l'homogénat.

Bretthauer et Irwin (18), qui utilisent le même procédé avec du dolichol (C₉₀-C₁₀₅) n'observent aucune activation, excepté en présence du dérivé phosphorylé du dolichol.

L'autre lipide de la fraction insensible à la desacylation alcaline ressemble à ceux décrits chez Hansenula holstii (18) et chez Cryptococcus (31). A part la résistance au traitement aux acides dilués, aucune autre propriété n'a été décrite, si bien que manquent tous les renseignements sur la structure et la fonction. En raison de son comportement vis à vis des alcalis et des acides, on peut suggérer son appartenance au groupe des sphingolipides, peut-être du type des cérébrosides.

Les accepteurs doivent être en relation structurale étroite avec les enzymes puisqu'ils restent associés pendant la disruption et la préparation de la fraction particulaire.

La solubilisation des enzymes se fait simultanément avec celle des accepteurs au moyen d'une solution de Triton-X-100. Les enzymes solubilisés montrent environ 30% de l'activité de l'enzyme particulaire pour l'incorporation lipidique et une activité très faible d'incorporation non lipidique (Tableau X). On peut donner plusieurs explications à ce phénomène :

a) les enzymes sont extraits par le détergent sous forme de micelles et présenteraient une conformation qui favoriserait l'incorporation lipidique par rapport à l'incorporation non lipidique; dans ce cas, on admettrait que la perte d'activité est due à une désactivation par la solubilisation des enzymes.

b) la solubilisation agirait plus spécifiquement sur les enzymes responsables de la synthèse des lipides, peut-être à cause de l'accessibilité des accepteurs qui favoriserait cette réaction.

c) le Triton-X-100 utilisé pour la solubilisation inhiberait la synthèse des polysaccharides sans influencer celle des lipides. Ce phénomène a été discuté dans le cas du transfert du mannose à partir du dérivé polyisoprénique sur les polysaccharides et semblerait le plus plausible.

Un essai de solubilisation enzymatique par le lysozyme sur M. lysodeikticus a été effectué. Dans ce cas, l'extract enzymatique se montre totalement inactif en ce qui concerne la synthèse des mannolipides. On voit qu'il existe une relation structurale directe entre les enzymes de biosynthèse des mannolipides et le mucopolysaccharide, de sorte que l'altération de ce dernier inactive cette biosynthèse lipidique spécifique.

La bacitracine inhibe la biosynthèse des peptidoglycanes des parois bactériennes par blocage d'une pyrophosphatase qui, selon Strominger (70), est essentielle pour la régénération de l'intermédiaire undécaprénol-phosphate. Chez S. pombe, on n'observe aucune inhibition de la synthèse lipidique par la bacitracine comme Lennarz (40) l'a observé chez M. lysodeikticus. Ceci est aussi en faveur de la structure d'un phosphodiester polyprénique dont le mécanisme de régénération serait différent de celui rencontré pour les dérivés pyrophosphorylés tels qu'ils sont décrits par Strominger (71).

4 - R E S U M E

De nombreux mannosides et polysaccharides sont formés enzymatiquement en utilisant le GDP-mannose qui représente la forme activée du sucre.

De tels systèmes sont décrits pour les bactéries (M. lysodeikticus), les levures (Hansenula holstii), les plantes et même les mammifères.

Il semble que quelques lipides soient en relation étroite avec la structure membranaire, tandis que d'autres représentent le stade final d'activation du sucre dans la biosynthèse des polysaccharides.

Les cellules utilisées sont : une levure : Schizosaccharomyces pombe et une bactérie : Micrococcus lysodeikticus. Les homogénats sont préparés par diverses méthodes telles que l'Eaton Press, la French Press ou l'action du lysozyme.

Les fractions particulières sont préparées par centrifugation différentielle.

La fraction particulière est incubée en présence de GDP-mannose et de ions Mn^{++} et les lipides, extraits par $CHCl_3$ -MeOH, sont lavés par une solution de NaCl 0,9% avant évaporation. La fraction lipidique obtenue est desacylée par NaOH/MeOH.

La radioactivité est transférée sur divers accepteurs endogènes. Une fraction marquée non lipidique contient, à côté des métabolites du mannose (mannose-P et glycérol) des macromolécules représentant une large partie de la radioactivité.

a) Les lipides alcali-sensibles donnent des composés hydrosolubles. Un premier composé : le mannosyl-glycérol est identifié par comparaison avec les lipides de M. lysodeikticus et le produit synthétisé chimiquement. La seconde fraction est composée d'une série de produits aux poids moléculaires plus élevés que celui d'un trisaccharide, et provenant de lipides oligosaccharidiques.

b) Les lipides résistants aux alcalis sont de deux sortes et sont différenciés par leur labilité aux acides dilués. Le premier n'est pas sensible au traitement par HCl 0,005 N, 5 min. à 100° C. et n'est pas identifié. Il s'agit probablement d'un dérivé d'un sphingolipide contenant du mannose.

Le second est labile aux acides dilués et ses propriétés chimiques et biochimiques sont très similaires à celles décrites dans la littérature pour les dérivés mannosyl-phosphoryl-polyisoprénols. La réversibilité de la réaction : GDP-mannose + accepteur lipidique $\rightleftharpoons$ GDP + accepteur lipidique-mannose est démontrée en incubant des lipides alcali-résistants marqués avec du GDP en présence de fractions particulières. On observe dans ce cas la formation de GDP-mannose marqué et parallèlement une diminution de la radioactivité dans la fraction lipidique.

Ces résultats sont en accord avec les propriétés décrites pour d'autres organismes où de tels composés représentent l'activateur final dans la biosynthèse des polysaccharides.

Un essai de solubilisation des enzymes par une solution de Triton-X-100 est effectué sur un homogénat total. Dans ce cas, l'incorporation dans les lipides est identique à celle obtenue sur une fraction particulière; la solubilisation n'est donc pas sélective. Les mannosides présentent les mêmes caractéristiques que les mannosides décrits ci-dessus. Une séparation des accepteurs lipidiques est effectuée par précipitation des enzymes par l'acétone.

5 - REFERENCES

- 1 Mahler, H.R. et Cordes, E.H. ; Biological Chemistry
Harper International Edition New York (1969) 332
- 2 Park, J.T. ; J.B.C. 194 (1952) 877-885-897
- 3 Leloir, L.F. et Cardini, C.E. ; JACS 79 (1957) 6340
- 4 Leloir, L.F. et Cardini, C.E. ; "Guanosine et Inosine
Nucléotides " ; The Enzymes Vol. 2 p.39. Academic New York
- 5 Cabib, E. et Leloir, L.F. ; J.B.C. 206 (1954) 779
- 6 Munch-Peterson, A., Kalckar, H.M., Culoto, E. et Smith, E.E.B.
Nature 172 (1953) 1036
- 7 Preiss, J. et Wood, E. ; JBC 239 (1964) 3119
- 8 Preiss, J. et Greenberg, E. ; Analyt. Biochem. 18 (1967) 464
- 9 Bosmann, H.B. ; BBA 187 (1969) 122
- 10 Bosmann, H.B. ; BBA 252 (1971) 369
- 11 Kanegasaki, S. et Wright, A. ; Proc. Natl. Acad. Sci. USA
67 (1970) 951
- 12 Wright, A., Dankert, M. et Robbins, P.W.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 54 (1965) 235
- 13 Weiner, J.M., Higushi, T., Rothfield, L.,
Saltmarsh-Andrew, A., Osborn, M.J. et Horecker, B.L.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 54 (1965) 228
- 14 Elbein, A.D. ; JBC 244 (1969) 1608
- 15 Forsee, W.T. et Elbein, A.D. ; JBC 248 (1973) 2858
- 16 Elbein, A.D. et Hassid, W.Z. ; BBRC 23 (1966) 311
- 17 Kosak, L.P. et Bretthauer, R.K. ; Bioch. 9 (1970) 1115
- 18 Bretthauer, R.K., Wu, S. et Irwin, W.E. ; BBA 304 (1973) 736
- 19 De Luca, L., Maestri, N., Rosso, G. et Wolf, G.
JBC 248 (1973) 641
- 20 Maestri, N. et De Luca, L. ; BBRC 53 (1973) 1344
- 21 Sentandreu, R. et Lampen, J.O. ; Febbs Lett. 14 (1971) 109
- 22 Sentandreu, R. et Lampen, J.O. ; Febbs Lett. 27 (1972) 331
- 23 Tanner, W., Jung, P. et Behrens, N.H. ;
Febbs Lett. 16 (1971) 245
- 24 Jung, P. et Tanner, W. ; Eur. J. Biochem. 37 (1973) 1
- 25 Tanner, W. ; BBRC 35 (1969) 144

- 26 Troy, F.A., Freeman, F.E. et Heath, E.C.;
JBC 246 (1971) 118
- 27 Clark, A.F. et Villemez, C.L.; Febbs Lett. 32 (1973) 84
- 28 Takayama, K. et Goldman, D.S.; JBC 245 (1970) 6251
- 29 Takayama, K. et Goldman, D.S.; BBA 176 (1973) 5693
- 30 Baynes, J.W., Hsu, A.F. et Heath, E.C.;
JBC 248 (1973) 5693
- 31 Ankel, E., Ankel, H. et Schutzbach, J.S.;
JBC 245 (1970) 3945
- 32 Schutzbach, J.S. et Ankel, H.; JBC 246 (1971) 2187
- 33 Richards, J.B., Evans, P.J. et Hemming, F.W.;
Biochem. J. 124 (1971) 957
- 34 Barr, R.M. et Hemming, F.W.; Biochem. J. 126 (1972) 1203
- 35 Khuller, G.K. et Brennan, P.J.; Biochem. J. 127 (1972) 369
- 36 Behrens, N.H. et Cabib, E.; JBC 243 (1968) 502
- 37 Algranati, J.D., Carminatti, H. et Cabib, E.;
BBRC 12 (1963) 504
- 38 Lennarz, W.J. et Talamo, B.; JBC 241 (1966) 2707
- 39 Scher, M., Lennarz, W.J. et Sweeley, C.C.;
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 59 (1968) 1313
- 40 Scher, M. et Lennarz, W.J.; JBC 244 (1969) 2777
- 41 Lahav, M., Chiu, T.H. et Lennarz, W.J.; JBC 244 (1969) 5890
- 42 Tetas, M. et Chao, H.; Arch. Bioch. Biophys. 138 (1970) 135
- 43 Macfarlane, M.G.; Biochem. J. 80 (1961) 45 P
- 44 Lennarz, W.J.; JBC 239 (1964) PC 3110
- 45 Vikas, E. et Lederer, E.;
Bull. Soc. Chim. Biol. 42 (1960) 1013
- 46 Angyal, S.J. et Shelton, B.; Proc. Chem. Soc. (1963) 57
- 47 Lee, Y.C. et Ballou, C.E.; JBC 239 (1964) 1316
- 48 Pangborn, M.C. et McKinney, J.A.
Journ. of Lipid Research 7 (1966) 627
- 49 Wagner, H et Zofczik, W.; Bioch. Zeitschrift 346 (1966) 343
- 50 Carter, H.E., Brooks, S., Gigg, R.H., Strobach, D.R.
et Suami, T.; JBC 239 (1964) 743
- 51 Carter, H.E., Strobach, D.R. et Hawthorne, J.N.
Biochem. 8 (1969) 383
- 52 Kates, M.; Techniques of lipidology (1972) p. 323
Eds: T.S. Work et E. Work. North-Holland/American elsevier

- 53 Lennarz, W.J. et Scher, M.G.; BBA 265 (1972) 417
- 54 Anderson, J.S., Matsushashi, M., Haskin, M.A. et Strominger, J.L.; Proc. Natl. Acad. Sci. USA 53 (1965) 881
- 55 Hussey, M.G. et Baddiley, J.; Bioch. J. 127 (1972) 39
- 56 Kauss, H.; Febbs Lett. 5 (1969) 81
- 57 Villemez, C.L. et Clark, A.F.; BBRC 36 (1969) 57
- 58 Caccam, J.F., Jackson, J.J. et Eylar, C.H.; BBRC 35 (1969) 505
- 59 Alam, S.S., Barr, R.M., Richards, J.B. et Hemming, F.W.; Biochem.J. 121 (1971) 19P
- 60 Behrens, N.H. et Leloir, L.F.; Proc. Natl. Acad. Sci. USA 66 (1970) 153
- 61 Waechter, C.J., Lucas, J.J. et Lennarz, W.J.; JBC 248 (1973) 7570
- 62 Eaton Norman, R.; J. Bacteriol. 83 (1962) 1359
- 63 Brockerhoff, H.; J. Lipid Research 4 (1963) 96
- 64 Kates, M. ; Techniques of Lipidology (1972) p. 558
Eds: Work, T.S. et Work, E.; North-Holland/American elsevier
- 65 Hassid, W.Z. et Abraham, S.; Methods in Enzymology Vol III (1957) p. 34
Academic Press Inc. New York; Eds: Colowick, S.P. et Kaplan N.O.
- 66 Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. et Randall, A.J.; JBC 193 (1951) 265
- 67 Li, Y.T. ; JBC 242 (1967) 5474
- 68 Higashi, Y., Strominger, J.L. et Sweeley, C.C.; JBC 245 (1970) 3697
- 69 Nikaido, H. , Nikaido, K. et Nakae, T.; JBC 246 (1971) 3697
- 70 Siewert, G. , Strominger, J.L.; Proc. Natl. Acad. Sci. USA 57 (1967) 767
- 71 Higashi, Y. , Siewert, G. et Strominger, J.L.; JBC 245 (1970) 3683

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION

Nucléotides-sucres :	
Généralités, propriétés, principales réactions	1
Mannolipides :	
Description, biosynthèse, rôle biologique	4

PARTIE EXPERIMENTALE

MATERIEL ET METHODES

Cellules utilisées et milieux de culture	12
Préparation d'homogénats et de fractions particulières	13
Solubilisation d'enzymes	14
Incubation enzymatique	14
Extraction et purification des lipides	15
Chromatographies des lipides	15
Desacylation	16
Chromatographie des produits de desacylation	17
Hydrolyse par les acides dilués	17
Hydrolyse des liaisons glycosidiques par l'acide trifluoroacétique	17
Chromatographie gazeuse des sucres	18
Dosage de protéines	18
Mesure de radioactivité	18
Microdosages d'activité enzymatique	18

RESULTATS

Influence des ions et des méthodes de rupture	20
Incorporation en fonction du temps	21
Etude des mannolipides de <u>S. pombe</u>	22
Séparation des lipides totaux, comparaison avec ceux de <u>M. lysodeikticus</u>	24
Hydrolyse alcaline des lipides de <u>S. pombe</u>	25
Fraction alcali-labile, identification	26
Fraction alcali-résistante, acido-labile	30
Solubilisation des enzymes chez <u>S. pombe</u>	34

DISCUSSION

38

RESUME

45

REFERENCES

47

